



116

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
CAMPUS IZTACALA**

**“VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES
NATURALES DE ALMEJA CATARINA
Argopecten ventricosus-circularis
(SOVERBY II, 1842)
DE LA COSTA PACÍFICO DE
BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
P R E S E N T A :
DELIA IRENE ROJAS POSADAS

200802



DIRECTOR DE TESIS: DRA. NORMA Y. HERNANDEZ-SAAVEDRA
Co- DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO N. MAEDA MARTINEZ

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Maria Luisa^a y Fernando por todo el amor, apoyo y confianza que he recibido.

A mis hermanos Paty, Luis y Luisa, ustedes son una motivación para seguir superandome.

Al pequeño Alex por traer nuevamente alegría a nuestro hogar.

A Rubén por sus consejos para seguir adelante, a mis tíos y tías que de alguna manera contribuyeron para continuar mi formación profesional: Pita, Paco, Carmen, Carlota, Jorge y Chayo.

A mis grades amigos Edgar, Luis, Gilberto, Cesar y Sandra por ser mi segunda familia y compartir momentos inolvidables.

A Norma y Arturo que me han brindado su amistad y apoyo incondicional más allá del trabajo.

A mi familia CIB: Reyna, Roy, Flor, Valerie y Pedro por brindarme su amistad.

A Izmene por compartir conmigo esta experiencia y brindarme su hogar.

A Nachito por estar conmigo en los momentos fáciles y en los más difíciles.

Especialmente a DIOS por esta oportunidad.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a mi directora de tesis, Dra. Norma Hernández y Dr. Alfonso Maeda por la oportunidad de trabajar con ellos, por su confianza y consejos para no darme por vencida y salir adelante.

También agradezco al CIBNOR por brindarme sus instalaciones, en particular al programa de posgrado por el apoyo económico que me proporcionaron.

A mis sinodales Irma Dueñas, Rafael Chávez, Elías Piedra y Ramón Moreno por sus acertados comentarios para mejorar este trabajo.

Agradezco al maestro Eduardo Balart y miembros de la tripulación del crucero, encargado de coleccionar los organismos para este trabajo.

A todos mis compañeros de Patología Marina, en especial a Pedro, Charly, Arturo Sierra y Toño por sus valiosos comentarios para enriquecer mi trabajo.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron a que mi estancia fuera amena, aún en momentos difíciles. Aunque sus nombres no aparezcan estarán siempre en mi mente.

GRACIAS.

CONTENIDO

Indíce General	i
Indíce de Figuras	iii
Indíce de Mapas	iii
Indíce de Tablas	iv
Glosario	v
Resumen	viii
I. Introducción.....	1
1.1 Características generales de <i>Argopecten ventricosus</i>	1
1.2 Ubicación Taxonómica	1
1.3 Distribución y biología	2
1.4 Importancia Económica	4
II. Antecedentes	8
2.1 Genética de poblaciones	13
2.2 Determinación de la variabilidad genética	14
III. Justificación	17
IV. Objetivos	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos particulares	17
V. Áreas de estudio	18
5.1 Guaymas	18
5.2 Bahía Concepción	19
5.3 Bahía de La Paz	21
5.4 Laguna San Ignacio	22
5.5 Bahía Magdalena	23
5.6 Ecuador	24

VI. Materiales y Métodos	25
6.1 Material biológico	25
6.2 Análisis enzimáticos	26
6.3 Aislamiento de ADN genómico	31
6.4 RAPD (random amplification of polymorphic DNA)	33
VII. Resultados	35
7.1 Análisis enzimáticos	35
7.2 Análisis de ADN	40
7.3 Análisis RAPD	41
7.3.1 Guaymas	46
7.3.2 Bahía Concepción	47
7.3.3 Bahía de La Paz	48
7.3.4 Laguna San Ignacio	49
7.3.5 Bahía Magdalena	50
7.3.6 Ecuador	51
VIII. Discusión	52
IX. Conclusiones	61
X. Recomendaciones	62
XI. Bibliografía	63
XII. Apéndice	74
12.1 Apéndice I.	74
12.1.1 Determinación de proteínas	74
12.1.2 Preparación de soluciones para evidenciar actividad enzimática	77
12.2 Apéndice II	79
12.2.1 Soluciones para el aislamiento de ADN	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de la concha de <i>A. ventricosus</i>	3
Figura 2. Diagrama de un genotipo homocigoto y heterocigoto Para una enzima dimérica	28
Figura 3. Electromorfos obtenidos con cinco sistemas enzimáticos (EST, ALP, G6PDH, LDH Y SOD)	35
Figura 4. Fenograma obtenido al analizar cinco sistemas enzimático y RAPDs	39
Figura 5. Electroforesis de ADN genómico	40
Figura 6. Fenograma obtenido al analizar los oligos 28 y 30	45
Figura 7. Bandas conservadas en la población de Guaymas utilizando los oligos 28 y 30	46
Figura 8. Bandas conservadas en la población de Bahía Concepción utilizando los oligos 28 y 30	47
Figura 9. Bandas conservadas en la población de Bahía de La Paz utilizando los oligos 28 y 30	48
Figura 10. Bandas conservadas en la población de Laguna San Ignacio utilizando los oligos 28 y 30	49
Figura 11. Bandas conservadas en la población de Bahía Magdalena utilizando los oligos 28 y 30	50
Figura 12. Bandas conservadas en la población de Ecuador utilizando los oligos 28 y 30	51

ÍNDICE DE MAPAS

Mapa 1. Distribución de <i>A. ventricosus</i>	2
Mapa 2. Localización geográfica de los bancos naturales <i>A. ventricosus</i>	5

Mapa 3. Localización geográfica de Guaymas	19
Mapa 4. Localización geográfica de Bahía concepción	20
Mapa 5. Localización geográfica de la Bahía de La Paz	21
Mapa 6. Localización geográfica de Laguna San Ignacio	22
Mapa 7. Localización geográfica de Bahía Magdalena	24
Mapa 8. Localización geográfica de Ecuador	24
Mapa 9. Localización geográfica de los sitios de colecta de <i>A. ventricosus</i>	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificación RAPD	34
Tabla 2. Número de <i>loci</i> analizados en cinco sistemas enzimáticos	36
Tabla 3. Frecuencias alélicas en seis poblaciones de <i>A. ventricosus</i>	37
Tabla 4. Resumen de la variabilidad genética en poblaciones de <i>A. ventricosus</i> mediante alozimas	38
Tabla 5. Número de <i>loci</i> obtenidos con los oligonucleotidos 28 y 30	41
Tabla 6. Frecuencias alélicas en seis poblaciones de <i>A. ventricosus</i> obtenidas mediante RAPDs	42
Tabla 7. Resumen de la variabilidad genética obtenida mediante RAPDs	44

Mapa 3. Localización geográfica de Guaymas	19
Mapa 4. Localización geográfica de Bahía concepción	20
Mapa 5. Localización geográfica de la Bahía de La Paz	21
Mapa 6. Localización geográfica de Laguna San Ignacio	22
Mapa 7. Localización geográfica de Bahía Magdalena	24
Mapa 8. Localización geográfica de Ecuador	24
Mapa 9. Localización geográfica de los sitios de colecta de <i>A. ventricosus</i>	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificación RAPD	34
Tabla 2. Número de <i>loci</i> analizados en cinco sistemas enzimáticos	36
Tabla 3. Frecuencias alélicas en seis poblaciones de <i>A. ventricosus</i>	37
Tabla 4. Resumen de la variabilidad genética en poblaciones de <i>A. ventricosus</i> mediante alozimas	38
Tabla 5. Número de <i>loci</i> obtenidos con los oligonucleotidos 28 y 30	41
Tabla 6. Frecuencias alélicas en seis poblaciones de <i>A. ventricosus</i> obtenidas mediante RAPDs	42
Tabla 7. Resumen de la variabilidad genética obtenida mediante RAPDs	44

GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Polinucleótido en el que el residuo del azúcar es desoxirribosa y que es el material genético primario de todas las células.

Alelo: (Contracción de alelomorfo), una de dos o más formas alternativas de un gen, los cuales pueden ocupar un *locus* particular en un cromosoma.

Aloenzima: formas variantes de una enzima que se encuentran en diferentes individuos de la misma especie y son el resultado de la existencia de múltiples alelos dentro de una población.

Deriva genética: variación en la frecuencia de los genes de una generación a otra debida a fluctuaciones al azar.

Electroforésis: técnica para separar moléculas basado en su movilidad diferencial en un campo eléctrico.

Endonucleasa: enzima que hidroliza enlaces fosfodiéster internos en un polinucleótido.

Enzima de restricción: endonucleasa que reconoce secuencias de nucleótidos específicas en el ADN y que efectúa una ruptura en el doble filamento de la molécula del ADN.

Fenotipo: características observables de un individuo, resultantes de la interacción entre el genotipo y el ambiente en el que ocurre.

Fenograma: diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos OTU o grupos de OTUS.

Genoma: contenido genético de una célula o virus.

Genotipo: suma total de la información genética contenida en un organismo.

Genética: rama de la biología que estudia los fenómenos de la herencia, la variación y las leyes que rigen las semejanzas y diferencias entre individuos con ascendencias comunes.

Genética de poblaciones: rama de la genética en la que se estudia la variabilidad genética de las poblaciones naturales, expresada en frecuencias genotípicas y alélicas, así como los mecanismos que la hacen variar en generaciones consecutivas.

Heterosis: incremento porcentual en desempeño de las cruzas sobre el promedio de las líneas parentales.

Endogamia: apareamiento de organismos relacionados entre sí.

Ley de Hardy-Weinberg: principio por el cual las frecuencias genotípicas pueden predecirse basándose en la frecuencia de los genes, suponiendo que hay apareamiento al azar.

Locus (plural *loci*): punto del cromosoma en el que se localiza un gene en particular.

OTU: Operational Taxonomic Unit= unidad taxonómica operativa.

Panmítico: aleatorio

PCR (polymerase chain reaction) en español (RCP) reacción en cadena de la polimerasa. Consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN.

Población: grupo de organismos de la misma especie que habitan una determinada área geográfica, y por ende se entrecruzan y comparten un acervo común de genes.

Primer: pequeña sección de ADN de una sola hebra o de ARN que al alinearse a una hebra complementaria más larga, se extiende por la ADN polimerasa a través de la longitud de la hebra de ADN más larga.

RAPD (random amplification of polymorphic DNA): amplificación al azar de secuencias de ADN usando oligonucleótidos con secuencias al azar.

RESUMEN

En el presente trabajo, mediante métodos histoquímicos (aloenzimas) y de biología molecular (RAPDs), se estimó la variabilidad genética en seis poblaciones naturales de almeja catarina (provenientes de los bancos naturales de B. Concepción, B. de la Paz, L. San Ignacio, B. Magdalena, Guaymas y Ecuador), con ambos marcadores genéticos se calcularon los siguientes estimadores: frecuencias alélicas y genotípicas, heterocigosis, polimorfismo, *ji* cuadrada y equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se analizaron los siguientes marcadores genéticos EST, ALP, G6PDH, LDH y SOD, evidenciándose nueve *loci*, de los cuales el *locus* SOD-2 fue polimórfico para las seis poblaciones estudiadas. La variabilidad genética fue baja teniendo valores promedio de 1.37 a 1.78 de alelos por *locus*. El polimorfismo promedio utilizando el criterio del 95%, fue de 50.00 a 88.88. Aunque este valor está próximo al promedio general de polimorfismo estimado para invertebrados marinos (58.7)(Maynard, 1989), es superior al que generalmente se encuentra en el phylum Mollusca (25-50%). La heterocigosis promedio esperada fue mayor en la población de Bahía de la Paz, observándose un exceso de heterocigotos, en el resto de las poblaciones se observó una deficiencia de heterocigotos. Al usar los RAPDs se revelaron un total de 23 *locus* con los oligos (28 y 30). Se obtuvieron valores promedio de 1.35 a 2.05 de alelos por *locus*. El polimorfismo promedio, utilizando el criterio del 95%, fue de 21.73 a 95.65. La heterocigosis promedio esperada fue mayor que la observada en todas las poblaciones estudiadas, presentándose un exceso de heterocigotos. Al comparar las técnicas utilizadas encontramos que la técnica de RAPD es más sensible, tiene mejor resolución y permite obtener resultados satisfactorios a muy corto plazo comparado con la técnica de aloenzimas. La aplicación de ambas técnicas en el monitoreo de la variabilidad genética de una población nos aportan datos que se pueden utilizar como herramienta en la determinación de cuotas de captura, así como marcadores genéticos específicos para cada población, los cuales nos permitirían conocer el origen geográfico de un organismo capturado dentro de las poblaciones estudiadas.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de *Argopecten ventricosus*

Los pectínidos o escalopas son moluscos bivalvos que han sido explotados intensamente en todo el mundo. Habitan las aguas costeras y por lo atractivo de su concha han sido adoptados por el hombre como símbolo distintivo de diversas actividades religiosas y culturales, sirviéndole como alimento fresco y nutritivo durante miles de años (Hardy, 1991).

La Super-familia Pectinaceae cuenta con más de 600 especies reconocidas entre fósiles y vivientes, se reconocen cerca de 350 especies vivas (Waller, 1995). Keen (1971) reconoce para el Pacífico Tropical Oriental 10 géneros, con 28 especies de las cuales cinco pertenecen a la Provincia Panámica.

1.2 Ubicación taxonómica

La almeja catarina se ubica en el siguiente marco taxonómico (Keen, 1971; Keen y Coan, 1974):

Phylum: Mollusca
Clase: Pelecypoda
Orden: Pterioidea
Familia: Pectinidae -Rafinesque, 1815-
Sub familia: Chlamydinae -Korobkov, 1860-
Género: *Argopecten* -Monterosato, 1889-
Especie: *Argopecten ventricosus* -Sowerby II, 1842-

De acuerdo a Keen (1971), la almeja catarina se conoce también como almeja catalina; algunos sinónimos científicos de la especie son:

Pecten filitextus -Linnaeus, 1830, *P. tumidus* -Sowerby, 1835-, *P. circularis* -Sowerby, 1835- *P. ventricosus* -Sowerby, 1842-, *P. inca* -Orbigny, 1846- y *P. solidulus* -Reeve, 1853-. Es un organismo de vida corta y generalmente no sobrevive más allá de los dos años. (Tripp-Quezada, 1985).

1.3 Distribución y biología

La almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842) se distribuye desde la Isla Cedros (Golfo de California) hasta Isla Galapagos y Paita, Perú (mapa 1).



Mapa 1. Distribución de *A. ventricosus*.

Habita bahías de fondo arenoso, areno-lodoso y areno-gravoso, en asociación con algas, pastos marinos y corales en profundidades de 1 a 35 m (Baqueiro *et al.*, 1983). *A. ventricosus* es un molusco bivalvo de conchas convexas en forma de abanico, aproximadamente iguales, que exhiben una amplia variedad de colores que van desde el blanco puro al moteado, con tonos de color anaranjado, púrpura y negro. Su forma inflada y sus 21 costillas, que parten desde el umbo en forma radial, son características de la especie (Avilés-Quevedo, 1990) (figura.1). Esta especie es considerada de vida corta (1 a 2 años) y crecimiento acelerado; su época de reproducción ocurre de febrero a abril en las poblaciones de la costa del Golfo de California y de marzo a junio en aquellas de la costa del Pacífico (Tripp-Quezada, 1985; Cáceres-Martínez *et al.*, 1990, Villalejo-Fuerte, 1992).

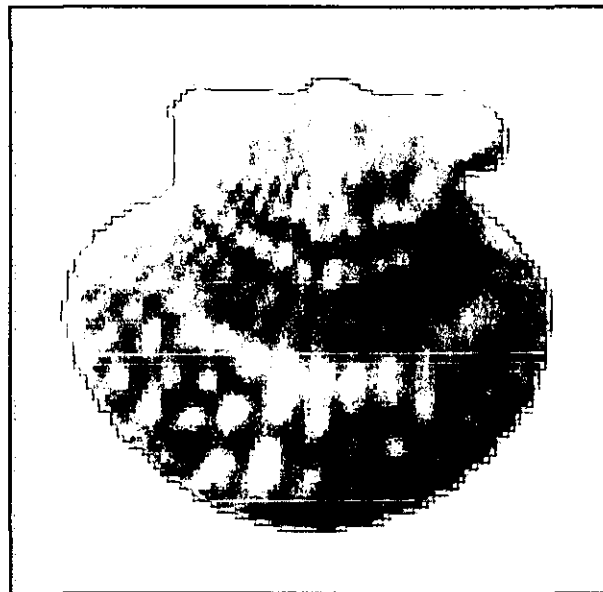


Figura 1. Morfología de la concha de *A. ventricosus*.

1.4 Importancia económica

La almeja catarina por ser un organismo de interés comercial, fácilmente colectable y accesible en la mayoría de las bahías donde habita, ha recibido mayor atención por parte de instituciones de investigación, las cuales han descrito los aspectos biológicos, pesqueros, ecológicos y económicos de la especie. Baja California Sur se caracteriza por ser el lugar natural para el desarrollo de la almeja catarina, y por ende, el único lugar del país donde se explota.

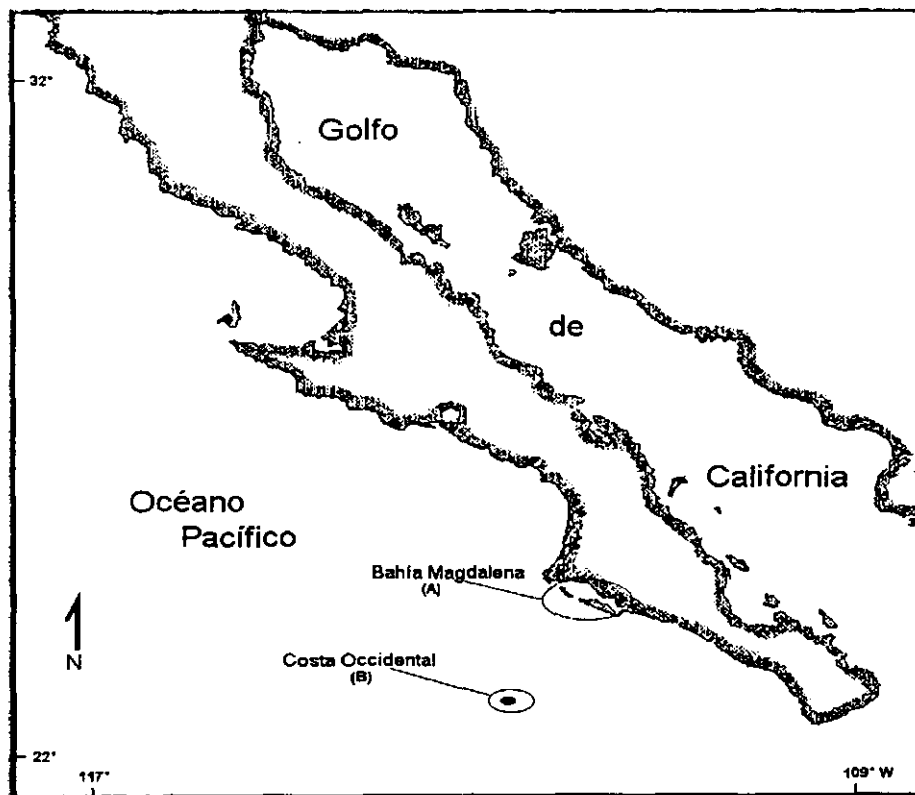
En México durante los últimos 15 años, la pesquería de almeja catarina *A. ventricosus* se ha incrementado gracias al buen mercado, el alto precio, la pesca eficiente y el buen método de procesamiento (callo y gonádas). Sin embargo, como los bancos naturales de la almeja catarina muestran grandes fluctuaciones en términos de distribución, densidad, tamaño, etc., resulta difícil predecir el futuro de la producción (Maeda-Martínez *et al.*, 1993), incluso, existen reportes que mencionan la desaparición total de poblaciones naturales de *A. ventricosus*, supuestamente debido a la sobreexplotación del recurso, tal es el caso de la Ensenada de La Paz en 1980 (Baqueiro *et al.*, 1981). Los estudios de evaluación genética y las características de producción pueden proporcionar información útil, ya que se trata de un recurso explotable en la acuicultura.

Por lo anterior, en México existe un sistema de control del aprovechamiento de las poblaciones naturales de los recursos marinos mediante el establecimiento de cuotas de captura (SEMARNAP). En el caso de los moluscos bivalvos, este se basa en prospecciones realizadas en los bancos naturales (CRIP), resultando el establecimiento de vedas temporales, así como tallas y cantidades del producto que pueden ser capturados. Las capturas de almeja catarina son muy variables, pero se han alcanzado volúmenes récord de más de 2500 toneladas métricas de callos por año durante 1989 y 1990 en Bahía Magdalena (en la costa Pacífico de B.C.S.); la

explotación de esos bancos, ha generado una derrama económica importante, beneficiando alrededor de 10,000 personas.

La formación de grandes poblaciones, como la que dio origen a esta producción, es un fenómeno esporádico que no puede ser fácilmente explicado.

Con base en estudios realizados por Maeda-Martínez *et al* (1993), se planteó la hipótesis de que los bancos de almeja dentro de Bahía Magdalena (mapa 2, zona A) no se producen localmente, sino que son el resultado del desove de grandes bancos que son inaccesibles para la pesca comercial, debido al fondo rocoso en la Plataforma Continental de la Península de Baja California (mapa 2, zona B).



Mapa 2. Localización de los bancos naturales de *A. ventricosus*.

Estas poblaciones fueron localizadas por investigadores del CIBNOR en un crucero de investigación en 1987 a bordo del Buque Oceanográfico El Puma, realizando arrastres con dragas a los 180 m de profundidad.

Cruz e Ibarra (1997) reportaron la existencia de dos poblaciones de almeja catarina que se distribuyen a lo largo de la costa de la Península de Baja California: una es la del Golfo de California y otra la costa Pacífico. Estas poblaciones presentan diferencias genéticas (que determinan las características, intra e interespecíficas de las dos poblaciones), que dan respuestas fenotípicas similares, en términos de crecimiento y sobrevivencia dentro de los bancos naturales.

Con base en observaciones detalladas obtenidas mediante estudios desarrollados en las bahías de La Paz, Magdalena y Concepción, en relación a la densidad de las semillas colectadas en presencia o ausencia de bancos de almeja catarina, se elaboró un modelo que propone que durante los años fríos, grandes volúmenes de larvas son transportadas al interior de las bahías, formando los grandes bancos que se depositan en el fondo (Maeda-Martínez *et al.*, 1993).

Entre los factores que influyen en el desarrollo de las poblaciones naturales de almeja catarina se puede mencionar: la temperatura, las corrientes marinas, la velocidad y dirección del viento, la presión de depredación, etc; sin embargo, aún se desconoce el efecto real de la explotación sobre las poblaciones. Adicionalmente, se tienen evidencias de que el reclutamiento de la almeja catarina en estado larval ocurre en el cefalotorax y en los apéndices de la langostilla *Pleuroncodes planipes* - Stimpson, 1860- que es una de las especies bento-pelágicas más abundantes de la plataforma continental de Baja California (Blackburn y Thorne, 1974). La distribución de las poblaciones de la almeja catarina coincide con la migración de la langostilla, y aunque no hay evidencias de migración por parte de éstas, es muy probable que ocurra en conchas muertas o en rocas. Sin embargo, el alto número de langostillas

que habitan dentro de la Plataforma Continental lo hacen un mecanismo primordial en el crecimiento y mantenimiento de las poblaciones (Maeda-Martínez *et al.*, 1993). Los mecanismos descritos acerca del reclutamiento de la almeja catarina, y la formación de un nuevo banco explotable en Bahía Magdalena, dependen del tiempo de residencia de la langostilla dentro de la bahía y de los regímenes de temperatura; aparentemente los bancos explotables se forman sólo en temperaturas de 16 °C o inferiores.

II. ANTECEDENTES

Debido a la importancia que tiene la almeja catarina en Baja California Sur, en los últimos años ha recibido gran atención por diversos centros de investigación en los que se han realizado estudios sobre su biología reproductiva: Rodríguez-Jaramillo *et al.*, (1987), describieron la evaluación del índice gonádico de rendimiento (IG) y condición de Marshall (K) de septiembre de 1986 a octubre de 1987; encontraron que el valor mínimo de IG se dio en septiembre de 1986 y que a partir de este mes se inicia una recuperación hasta febrero de 1987. Los resultados de este estudio preliminar, indican que *A. ventricosus* presenta alternancia irregular en el vaciado de las gónadas, seguida de una restauración inmediata (30-35 días), después de la emisión de gametos y una fase de reposo sexual corta.

Felix-Pico, (1993), realizó un estudio biológico sobre las características morfométricas de la especie como son: la relación entre la altura y el peso, el rendimiento muscular, ciclo anual de reproducción y fauna asociada en dos bancos de Bahía Magdalena; se determinó que las fluctuaciones del peso estandar se asocian con los principales cambios fisiológicos de la almeja catarina en un ciclo anual, siendo notable la baja de dicho peso durante la temporada de reproducción. El índice de rendimiento muscular más alto se registro en invierno de 1989, coincidiendo con un desove importante. La fauna de acompañamiento constó de 75 especies que representan la mayoría de los grupos taxonómicos, presentes en la zona como son crustáceos, hidrozooos, moluscos, equinodermos y ascidiceos.

Luna-González (1997), realizó un estudio sobre el ciclo reproductivo de la almeja catarina utilizando técnicas histológicas e histoquímicas. Por medio de la histoquímica se analizaron los carbohidratos y lípidos en la gonada, manto y músculo.

El estadio de desarrollo se observó durante todo el año a excepción de junio, reportando que el estadio de madurez predominó en agosto, octubre, noviembre, diciembre, febrero y marzo; mientras que el desove ocurrió principalmente en abril, mayo, julio, septiembre y enero.

Villalejo-Fuerte (1992), analizó el ciclo reproductivo y su relación con la condición somática de los organismos y algunos factores ambientales en Bahía Concepción. Se encontró que *A. ventricosus* es hermafrodita funcional y su periodo máximo de reproducción ocurre en invierno y primavera (y dos periodos menores al inicio del verano y al final de este). La maduración de la gónada se presentó en organismos de 35 mm de longitud anteroposterior y el desove en ejemplares de 47 mm. La talla mínima de madurez y desove de la población fué de 58 mm. La condición del músculo aductor y la gónada están sujetos a un ciclo de oscilación alternado, con una condición óptima del músculo en verano y disminución en el invierno, periodo en que existe un desarrollo de la gónada.

Felix-Pico y Sánchez (1976), analizaron las pesquerías y potencial de cultivo reportaron que la explotación de la almeja catarina iba en aumento identificándose la captura por operación; además el análisis de la población presentó un incremento de tallas pequeñas en la temporada de otoño. Esta situación ocasionó la sobreexplotación del recurso en virtud de que la gente que se dedicaba a la captura de este recurso carecía de permiso de pesca y no pagaban impuestos de explotación.

Tripp-Quezada (1985), reportó que en el Estero Santo Domingo en los años de 1978 y 1979 la almeja catarina sufrió una fuerte explotación pesquera, ante estas evidencias de sobreexplotación, fue diseñado un programa para su estudio y a la vez desarrollar una metodología para su cultivo. En el Estero Santo Domingo la almeja catarina en condiciones de cultivo semicontrolado, alcanzó su madurez

sexual entre los siete y ocho meses de vida, desovando masivamente en invierno. El crecimiento fue rápido alcanzando su talla comercial (50 mm) entre seis y ocho meses de vida, dependiendo de la densidad, el arte de cultivo y la zona.

Monsalvo-Spencer *et al* (1997), realizaron estudios sobre la maduración gonádica e inducción al desove de almeja catarina *A. ventricosus*. La inducción al desove se efectuó por termoestimulación combinado con la adición de producto sexual obtenido del desove del 50% de animales, siendo el único método en el cual se obtuvieron ambos gametos. El desove de machos inicio en mayor proporción que el de las hembras, se encontró que la serotonina sólo indujo al desove a machos mientras que la inyección de KCl y choques eléctricos no mostraron buenos resultados.

Estudios nutricionales: Lora-Vilchis *et al.*, (1997), realizaron un estudio sobre la ingestión, tamaño e índice digestivo en larvas veliger de almeja catarina, utilizando microscopia de epifluorescencia; probaron 10 microalgas durante los primeros 7 días de vida, encontrando que existe una correlación positiva entre la dimensión geométrica de las algas y el tamaño larval. Sólo fueron ingeridas las microalgas *Nannochloris oculata*, *Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros calcitrans*, *Thalassiosira pseudonana*, (clona 3H) y *Phaeodactylum tricorutum*; mientras que *Thalassiosira pseudonana*, (clona s78), *Tetraselmis suecica* y *Donaliella tertiolecta* no fueron ingeridas.

Sicard-González (1999), determinó la temperatura letal media y superior a 96 horas de exposición TLM₉₆ en juveniles y adultos de una población de almeja catarina (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842) en una población del sur de Bahía Magdalena (Bahía Almejas), en la Costa Occidental de Baja California Sur, encontrando que la TLM₉₆ fué de 29 °C. Las almejas sobrevivieron entre los 16 y 28 °C durante el tiempo de experimentación; la TLM obtenida en este trabajo fué baja

considerando la temperatura máxima en los cuerpos de agua donde se extrae este recurso; por otra parte, la temperatura óptima estuvo entre los 19 y 22 °C, la tasa de ingestión y aclaramiento fué mayor a 22 °C.

Morquecho-Escamilla (1996), realizó un estudio cuantitativo y cualitativo del componente fitoplanctónico, estudió la interacción ambiente-dinoflagelados-actividad de ficotoxinas, en Bahía Concepción realizando un registro de las variables fisicoquímicas. Este análisis permitió establecer la presencia de especies de dinoflagelados potencialmente tóxicos como *Dinophysis caudata*, *Ceratium furca*, *Prorocentrum micans* y *Prorocentrum compressum*. Con el método para la extracción de toxinas paralíticas (bioensayo en ratón), se evidenció la actividad de estas en la almeja catarina durante marzo y junio, con niveles que sobrepasaron la norma 400 UR (límite máximo permisible para el consumo humano de moluscos).

Rodríguez-Paz Rubio (1993), desarrolló una técnica de espectrofotometría, con la cual determinó el número cromosómico diploide que se encuentra en la almeja catarina (22 y 30), teniendo un rango de confiabilidad del 30%, así mismo verificó que la forma más rápida y efectiva de inducción al desove es por medio de la utilización de un neurotransmisor (serotonina); por otra parte menciona que el método espectrofotométrico de cuantificación de ácidos nucleicos es aplicable en la detección de triploidias en moluscos bivalvos.

Cruz-Hernández (1997), determinó diferencias genéticas entre poblaciones de *A. ventricosus* de Bahía Magdalena y Bahía Concepción, evaluando crecimiento y supervivencia en estadio larval y adultos, así como la presencia de heterocigosis para crecimiento durante el periodo de cultivo. Se observó un mayor efecto materno en el crecimiento al inicio del cultivo y una heterosis final de 6.8%. El efecto del medio ambiente sobre el crecimiento y supervivencia reveló que Bahía Magdalena es un sitio con mejores condiciones para el crecimiento de la almeja catarina,

recomendando el uso de poblaciones nativas para la implementación de programas de mejoramiento genético y/o repoblamiento.

Ibarra *et al* (1997), estudiaron el efecto de la densidad de organismos sobre el crecimiento y la supervivencia de dos poblaciones de *A.circularis*, la evaluación de ambas variables se efectuó en larvas; la población de Bahía Magdalena mostró un crecimiento significativamente mayor pero con igual supervivencia al comparar las densidades de 10 y 20 larvas/mL. Las larvas de Bahía Concepción crecieron mejor en densidades de 15 y 20 larvas/mL que en las de 5 a 10 larvas/mL.

Cruz *et al* (1998), realizaron un estudio sobre las diferencias genéticas, heterosis, crecimiento y sobrevivencia en dos ambientes nativos de almeja catarina (Bahía Magdalena y Bahía Concepción). La sobrevivencia entre las poblaciones estudiadas, demostró una elevada sensibilidad en el medio ambiente, con una sobrevivencia mas baja en la población de Concepción. La heterosis y el crecimiento indicaron algunos grados de dominancia en la escala genética, la heterosis en Concepción fué significativamente mayor que en Magdalena. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la población de Concepción está adaptada para crecer y sobrevivir en un ambiente estresante, dichas condiciones son características de Bahía Concepción, las cuales no se presentan en Bahía Magdalena.

2.1 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones permite estudiar las características genéticas de una población, con base en la descripción de los genes que causan diferencias cualitativas entre los individuos que la integran. Son entonces las frecuencias génicas, genotípicas y fenotípicas las que definen las características de la población. Sin embargo las frecuencias y el grado de dominancia de los genes, así como el modo de aparearse los individuos son los factores responsables de la cuantía y frecuencia de las clases genotípicas y fenotípicas de la población (Molina-Galán, 1992).

El cambio genético en las poblaciones y el entrecruzamiento se produce a través de los procesos de mutación, migración, deriva al azar y selección natural. La mutación es la fuente última de toda la variación genética. La migración o flujo génico de una población a otra de la misma especie puede aumentar la variación genética en las poblaciones locales.

Dado que todas las poblaciones son finitas, las frecuencias genéticas cambian de una generación a otra debido a accidentes en el muestreo; cuanto más pequeña es la población, mayor es el efecto de la deriva genética al azar sobre las frecuencias genéticas.

La cantidad de variación genética de una población es un parámetro fundamental en los estudios evolutivos, dado que la variación genética determina el potencial evolutivo de las poblaciones (Ayala, 1980).

Los estudios de variabilidad genética en poblaciones naturales han aportado información valiosa acerca de los procesos evolutivos que intervienen en la adaptación de las especies a los ambientes que habitan (Valentine, 1980).

2.2 Determinación de la variabilidad genética

Combinando la técnica de electroforesis con métodos de tinción histoquímicos, Hunter y Markert (1957) desarrollaron la técnica del zimograma, para identificar enzimas en extractos de tejido. Su aplicación pronto condujo al importante descubrimiento de las isoenzimas o formas moleculares múltiples de enzimas (Markert y Mollert, 1959). Esta técnica fué introducida en la biología de poblaciones cuando Lewontin y Hubby (1966) intentaron sistemáticamente medir la variación génica en poblaciones naturales seleccionando muestras de proteínas elegidas al azar para encontrar las aloenzimas (producto de alelos) que son variantes genéticamente controladas de las isoenzimas (producto de genes diferentes).

En los últimos años se han desarrollado y utilizado multiples técnicas para monitorear la variación genética de las especies, dentro de las más exitosas se pueden mencionar la electroforesis en geles de almidón (aloenzimas) y más recientemente, el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

En la actualidad, la mayoría de los trabajos de identificación de diversidad genética en camarones peneidos y algunos bivalvos consideran el análisis de la variabilidad de aloenzimas. Esta técnica había representado una nueva y sencilla metodología para estudios de variabilidad genética en individuos y poblaciones. Existen muchas y diversas variaciones de las técnicas electroforéticas, pero todas dependen de la capacidad migratoria de las moléculas cargadas cuando se les coloca en un campo eléctrico. La mayor parte de las veces se ubica a las proteínas en cierta localización y estas migran de alguna manera a través del medio de soporte para responder a la corriente aplicada (Karp, 1987).

Parte de la motivación de los estudios poblacionales en almejas se tienen de estudios similares en otras especies de bivalvos marinos. Estos estudios, indican un polimorfismo de aloenzimas relativamente pequeño (Lester, 1983, Sunden y

Davis, 1991), sin embargo, ya se conocen aquellas enzimas que nos pueden proporcionar mayor información acerca de la variabilidad genética de las especies; dentro de los estudios realizados con aloenzimas se pueden mencionar los trabajos de: Ríos *et al.*, (1999) utilizaron aloenzimas para comparar las diferencias genéticas en dos especies del género *Flexopecten*; De la Rosa-Velez (1986) realizó un estudio de variabilidad genética poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica*; Ríos *et al.*, (1999) realizaron estudios para comparar la relación genética entre poblaciones del género *Pecten jacobaeus* y *Pecten maximus*. Por otro lado, mediante esta técnica se han desarrollado estudios en los que se ha determinado el grado de polimorfismo de varias especies del género *Penaeus* (Lester, 1983).

La técnica de RAPD ha sido aplicada por Hirschfeld *et al* (1999), para evaluar la diversidad genética de *Crassostrea virginica*; Beaumont y Catalan-Aleman (1999) identificaron larvas de camarón en el género *Penaeus*; Sudeh y Davis, (1991) evaluaron la variación genética en poblaciones domésticas de *P. vannamei*; García *et al.*, (1994) observaron la diversidad genética en un cultivo de *P. vannamei* utilizando tres técnicas de genética molecular mientras, que García y Benzie, (1995) utilizaron esta técnica como un marcador de uso potencial en *P. monodon*.

La técnica de RAPD desarrollada por Williams *et al.*, (1990) y Welsh y McClelland, (1990), se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e involucra el uso de oligonucleótidos cortos (10 bases) que amplifican segmentos del genoma al azar.

El análisis de RAPD puede proveer de más información sobre la variación genética de una especie (y a menor costo) que el uso de las técnicas de aloenzimas. Adicionalmente, uno de los usos más importantes del RAPD es la posibilidad de detección de marcadores población-familia-específicos.

Los estudios de ácidos nucleicos (RAPD) son utilizados como marcadores de variabilidad genética debido a que no existen mapas genómicos completos para la mayoría de los organismos a pesar de que estos comprenden marcadores de ADN estrechamente relacionados, aunque han demostrado estar genéticamente ligados a un linaje de interés y pueden utilizarse para clonar genes, en diagnósticos médicos y para introgresión de linajes en programas de cruza en plantas y animales.

En la amplificación de ADN genómico con primers simples de secuencias nucleotídicas arbitrarias (RAPD), los primers detectan polimorfismo en ausencia de información nucleotídica específica, y el polimorfismo, en si mismo, funciona como un marcador genético y puede utilizarse para crear mapas genéticos (Williams *et al.*, 1990). A través de estas técnicas se han logrado demostrar diferencias altamente significativas en frecuencias génicas de poblaciones dentro de amplias zonas geográficas (Elo, 1995; García *et al.*, 1994; Mattoccia *et al.* 1986). Esta técnica que ha sido ampliamente utilizada tiene las virtudes de: 1) no requerir muestras de tejido mayores a 500 mg; 2) ser relativamente sencilla y rápida de ejecutar (Sakallah *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1990); 3) ser suficientemente sensible para delimitar diferencias entre poblaciones y 4) tener resultados que corresponden con los de aloenzimas (Benzie *et al.*, 1993).

III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años las poblaciones de almeja catarina han disminuido considerablemente repercutiendo en la pesquería. El estudio de la genética de poblaciones, con la ayuda de técnicas de bioquímica enzimática y biología molecular, permite hacer una estimación de la variabilidad genética de las poblaciones estudiadas.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad genética en poblaciones naturales de almeja catarina presentes en los márgenes costeros de Baja California Sur.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Establecer diferencias genéticas en las poblaciones naturales de almeja catarina, en base a patrones de isoenzimas y RAPD'S.
2. Determinar la sensibilidad de las técnicas de isoenzimas y RAPD'S para estimar la variabilidad genética en poblaciones naturales de almeja catarina.

V. ÁREAS DE ESTUDIO

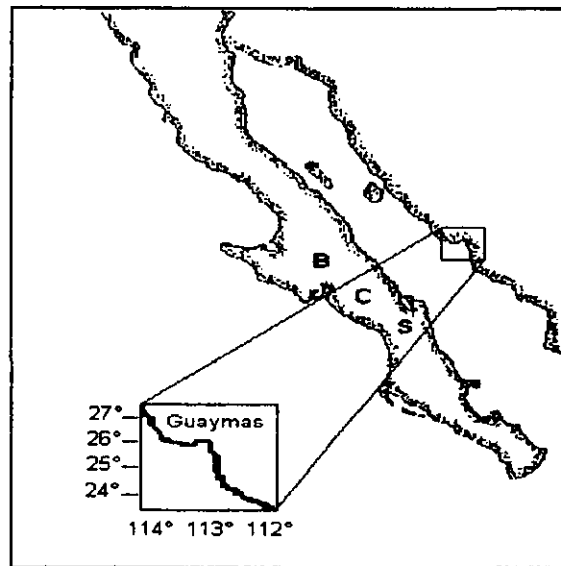
El estado de Baja California Sur se localiza en el noroeste de la República Mexicana entre los paralelos 22° 52' 40" a 28° 00' 00" de latitud Norte y entre los meridianos 109° 25' 28" a 115° 04' 45" de latitud Oeste. Al norte limita con el estado de Baja California (paralelo 28°), al sur y al oeste con el Océano Pacífico y al este con el Golfo de California; Baja California Sur abarca una extensión de ambos litorales de 2 200 km. Cuenta con una superficie de 70 470.98 km² y ocupa el doceavo lugar como entidad federativa en función de su extensión, misma que representa el 3.76% del territorio nacional y el 51.2% de la correspondiente península. Su longitud promedio es de 750 km, su anchura máxima es de 100 km (en la región del Vizcaíno) y la mínima de 42 km (en una zona localizada a 55 km al norte de la ciudad de La Paz). La topografía presente alcanza alturas que van desde la zona litoral hasta las estribaciones de las sierras que reportan 2,080 msnm. El clima presenta muchas variantes, producto de su configuración y su posición, con respecto al resto de la República Mexicana; de manera particular está el factor topográfico y las corrientes marinas.

5.1 GUAYMAS

El puerto de Guaymas (mapa 3) se localiza en el estado de Sonora entre los 27° 31' 20" de latitud Norte y los 110° 59' 07" latitud Oeste, a una altitud de 15 msnm. Este estado actualmente es considerado uno de los principales puertos del Pacífico Mexicano por su amplio desarrollo pesquero. Cuenta con una superficie aproximada de 39.5 km², una profundidad promedio de 8.5 m y está comunicada con el Golfo de California por una entrada de 1.2 km de ancho situada al sur (Díaz *et al.*, 1969).

La Bahía se puede dividir en tres zonas bien definidas, denominadas estero El Rancho, La Laguna y el Área del Puerto (Ochoa, 1987).

El tipo de clima que prevalece en la región corresponde a clima seco desértico, con heladas ocasionales y dos temporadas de lluvias muy marcadas. La mayor parte de la bahía esta compuesta de limo-arcillas, afectadas por la profundidad. El área suroeste es una zona de arrastre terrígeno, con presencia de manglares y con un alto porcentaje de arena limo-arcilla, lo cual se explica por la contribución terrígena de los desagües de ese lugar (García, 1971).



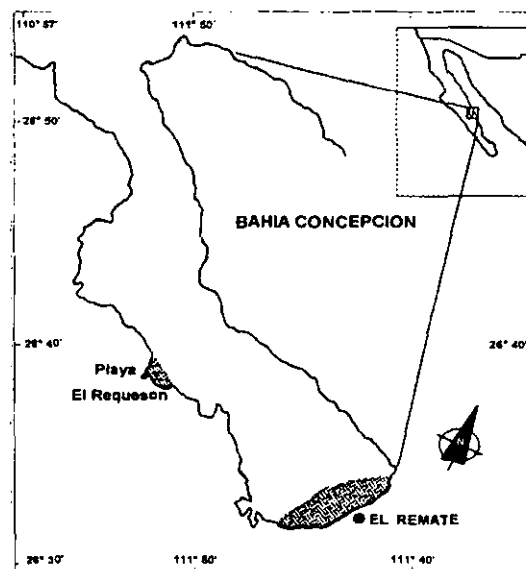
Mapa 3. Localización geográfica de Guaymas.

5.2 BAHÍA CONCEPCIÓN

Bahía Concepción es un cuerpo de agua bien definido que se localiza en la Costa Occidental del Golfo de California y se encuentra orientada en dirección Noroeste-Suroeste entre los paralelos $26^{\circ} 30'$ y $26^{\circ} 55'$ de latitud Norte y $111^{\circ} 40'$ y $112^{\circ} 00'$ de longitud Oeste. Mide aproximadamente 45 km de largo y alrededor de 9 km en su parte más ancha (Ramírez Guillen, 1983) (mapa 4).

Es un cuerpo de agua generalmente somero, con una profundidad media de 22 m y una máxima de 37 m en la porción central (Baqueiro *et al.*, 1983).

La entrada o boca de la bahía tiene aproximadamente 25 m de profundidad y está aislada por un umbral localizado en la región más estrecha con profundidades de 10 a 15 m. La parte central, forma una cuenca, que está delimitada por el umbral localizado hacia la boca; la región más sureña está delimitada por una extensa planicie llamada El Remate. La costa oriental es predominantemente arenosa y con pendientes suaves, la occidental es rocosa, con acantilados y algunas playas arenosas (Baqueiro *et al.*, 1983). La bahía presenta una temperatura media superficial de 24.5 °C pero fluctúa ampliamente de invierno (17.5 °C) a verano (34.8 °C) (Mateo, 1993) y como consecuencia de su relativo aislamiento alcanza temperaturas más altas durante el verano en comparación con las aguas del Golfo.

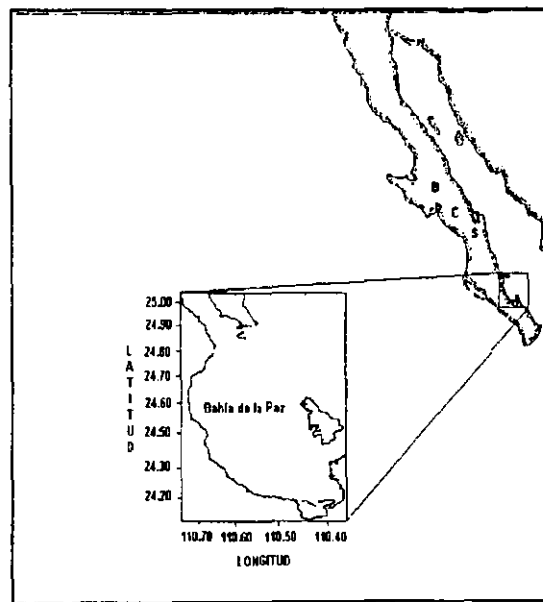


Mapa 4. Localización geográfica de Bahía Concepción.

5.3 BAHÍA DE LA PAZ

La Bahía de La Paz se localiza en la costa Sur Oriental de la Península de Baja California, entre los 24° 06' y 24° 47' latitud Norte y los 110° 16' y 110° 45' latitud Oeste a 200 km de su extremo. Su longitud es de 90 km y su ancho de 60 km con un área de aproximadamente 4 500 km² y se comunica a través de dos bocas con la parte sur del Golfo de California, una al Noreste (Boca Grande) y otra al Este (Boca Chica o Canal de San Lorenzo) (mapa 5).

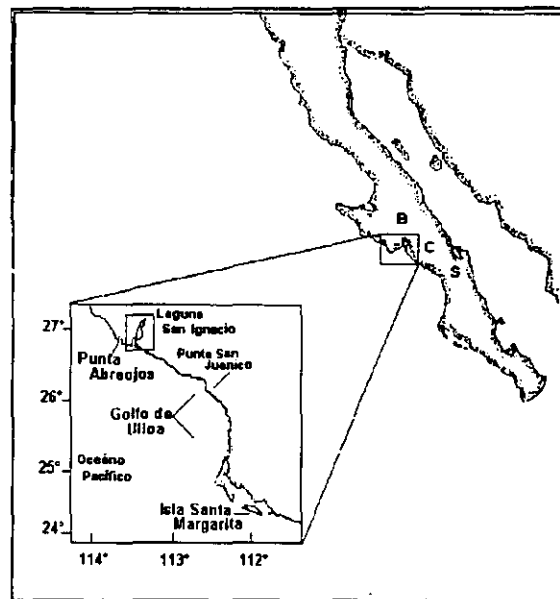
La batimetría de la mitad noroeste de la bahía indica una región profunda (400 m) separada por un umbral en la Boca Grande (250 m). Hacia el Sur disminuye la profundidad gradualmente hasta llegar a una parte somera con pendiente suave y playas extensas (Anónimo, 1982). La profundidad máxima del Canal de San Lorenzo es de 19 m. Las temperaturas son prácticamente iguales horizontalmente, en la vertical varían desde 20 °C en la superficie hasta 10 °C en el fondo.



Mapa 5. Localización geográfica de la Bahía de La Paz.

5.4 LAGUNA SAN IGNACIO

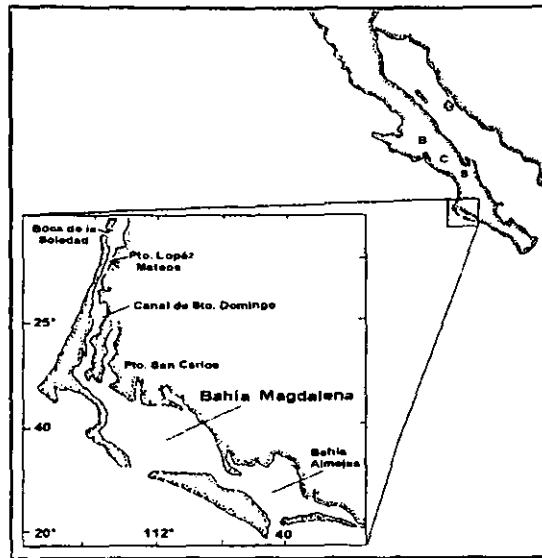
La Laguna San Ignacio, se localiza en la costa Occidental de la Península de Baja California entre los 26° 43' y 26° 58' de latitud Norte y entre los 113° 08' y 113° 16' de longitud Oeste. Esta laguna costera se encuentra rodeada por el desierto del Vizcaino, es una laguna somera, presenta una profundidad de 2 a 4 m en su mayor parte, llegando hasta los 20 m en los canales que la comunican con el océano (Swartz y Cummings, 1978). El interior de la laguna tiene un sistema de canales separados por grandes y extensos bajos de arena, muchos de los cuales quedan expuestos durante la marea baja. Su costa esta representada por playas arenosas, areas de conglomerados roca-concha y zonas de manglares compuestos por *Rhizophora mangle* (mapa 6).



Mapa 6. Localización geográfica de Laguna San Ignacio.

5.5 BAHÍA MAGDALENA

Bahía Magdalena se localiza en las costas del Pacífico de la Península de Baja California entre los paralelos 24° 15' - 25° 20' latitud Norte y 111° 20' - 112° 15' latitud Oeste y ocupa una área de 1 390 km² (Alvarez *et al.*, 1975) (mapa 8). Está dividida en tres grandes zonas. La Bahía noroeste, de forma irregular, presenta numerosos bajos, esteros, lagunas y canales con una profundidad promedio de 3-5 m. La zona central, conocida como Bahía Magdalena, está directamente comunicada con el Océano Pacífico a través de una boca ancha de 3 m de profundidad que se encuentra entre Isla Santa Margarita e Isla Magdalena. Finalmente la zona suroeste es conocida como Bahía Almejas, es un área poco profunda que tiene comunicación con el Océano Pacífico a través de un canal de 10 m de profundidad localizado entre Isla Santa Margarita e Isla Creciente. Las zonas central y suroeste están conectadas por un canal de 10 m de profundidad y de 2.5 km de ancho. El piso oceánico de Bahía Magdalena está compuesto de sedimentos, arena y barro (Chávez y Schmitter 1991) que se encuentran frecuentemente en los esteros que estan rodeando la línea de costa. En estas áreas se encuentra el gran pasto *Zostera marina* y los grandes bancos de macroalgas (Sánchez *et al.*, 1989) que se forman de mayo a diciembre.



Mapa 7. Localización geográfica de Bahía Magdalena.

5.6 Ecuador

Los organismos de esta localidad fueron donados por el Centro Nacional de Investigaciones Marinas de Ecuador (CENAIM). La colecta de los reproductores de los organismos estudiados se realizó entre los 2° 00" - 2° 20" latitud Sur y 80° 50" - 81° 10" latitud Oeste.

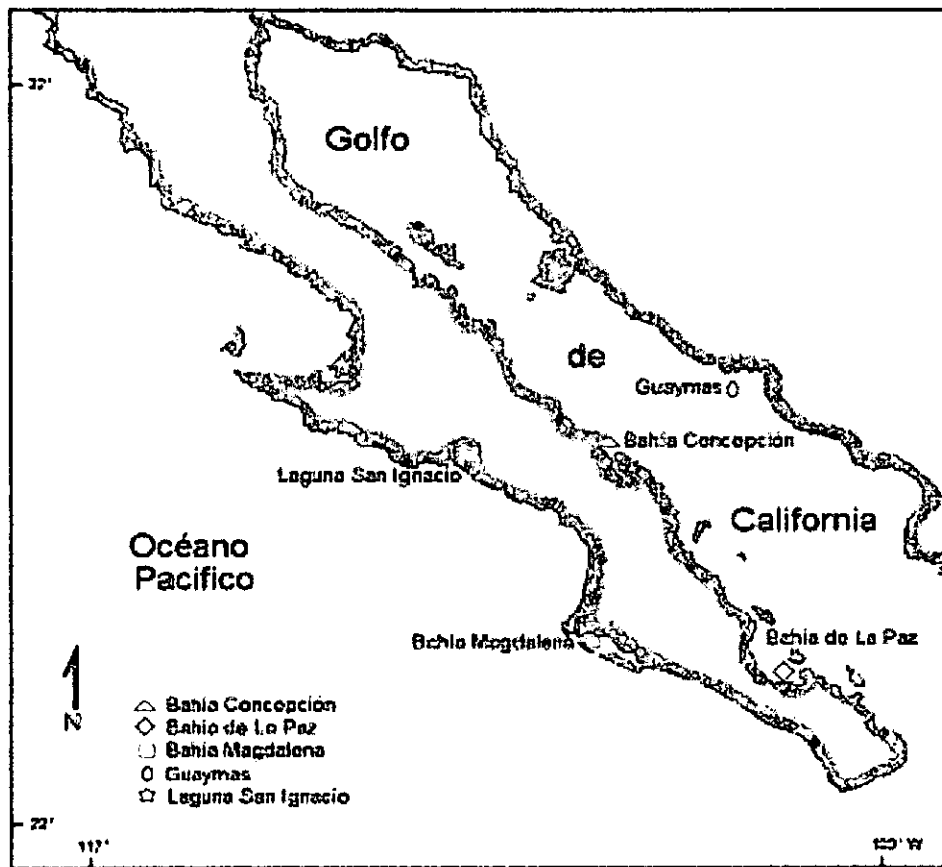


Mapa 8. Localización geográfica de Ecuador.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Los organismos para este estudio fueron proporcionados por el laboratorio de Biología Marina del CIBNOR, los cuales provienen de los bancos naturales de Guaymas, Bahía Concepción, Bahía de La Paz, Laguna San Ignacio y Bahía Magdalena (mapa 9). Adicionalmente el Centro Nacional de Investigaciones Marinas de Ecuador (CENAIM) proporcionó ejemplares de las poblaciones de la localidad de Ecuador.



Mapa 9. Localización geográfica de los sitios de colecta de *A. ventricosus*.

El número de organismos proporcionados de cada localidad fue el siguiente:

Guaymas	30
Bahía Concepción	10
Bahía de La Paz	28
Laguna San Ignacio	41
Bahía Magdalena	8
Ecuador	30

Una vez colectados los organismos experimentales, se guardaron individualmente en bolsas de polietileno, colocando dentro una tarjeta con los siguientes datos: número de individuo, lugar y fecha de colecta; estos fueron conservados vivos a una temperatura de 4 °C hasta su disección en el laboratorio. Los organismos fueron transportados al laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Patología Marina del CIBNOR donde se realizó la disección del músculo aductor (congelado a -80 °C hasta su posterior uso)

6.2 Análisis enzimáticos

Se disectaron secciones de tejido de aproximadamente 100 mg de músculo aductor, aún congelado. Las secciones de tejido se colocaron en tubos Eppendorf de 1.7 mL con 500 µL de tampón Tris 50 mM pH 8.0, la homogenización del tejido se realizó mediante un microhomogenizador Kontes (Pellet Pestle Motor). Durante este proceso los tubos se mantuvieron en un baño con hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas. Una vez que se obtuvo el homogenizado los tubos se centrifugaron a 8944 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido (350 µL) fué transferido a un tubo nuevo. De cada extracto se preparó una dilución 1:500 (Apéndice I).

La concentración de proteínas se determinó con un espectrofotómetro Beckmam DU 640 a partir de la absorbancia a 750 nm por el método de Lowry *et al.*, (1951). De los extractos se prepararon soluciones stocks de 0.6 mg/mL de proteínas.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE NATIVA)

Se prepararon geles en discontinuo de acrilamida-bisacrilamida 7.5% (Apéndice I). De cada solución stock de proteínas (0.6 mg/mL) se tomaron 50 μ L y se llevaron a un volúmen final de 250 μ L con agua destilada, agregandoles 50 μ L de tampón de carga (Apéndice I) para obtener un volúmen final de 300 μ L (0.1 μ g/mL). De esta mezcla se cargaron 4 μ g de proteína (40 μ L) en cada pozo del gel; la electroforesis se realizó en una cámara Mini Protean II (BIO-RAD), la cual contenía tampón de corrimiento Tris Glicina Nativa 1X (Apéndice I), enfriado a una temperatura de 10 °C. La electroforesis se dejó correr a un voltaje constante de 40 V hasta que la banda formada por el azul de bromofenol del tampón de carga pasara el gel de empaquetamiento, posteriormente el voltaje se incrementó a 70 V. Durante la electroforesis, la cámara se mantuvo en un cuarto frío a 10 °C durante cuatro horas. Finalmente los geles se tiñeron con una solución enzima-específica para evidenciar actividad enzimática.

Tinción específica

Se prepararon soluciones para evidenciar las siguientes enzimas: Esterasa (EST), Fosfatasa Alcalina (ALP), Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PD), Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Superóxido Dismutasa (SOD) (Manchenko, 1994) (Apéndice I).

Una vez que se tuvieron los geles teñidos y revelados se procedió a secarlos, utilizando dos marcos de acrílico y papel celofán, el cual se colocó previamente en agua para hidratarlo. Cada uno de los geles se observó sobre una lámpara de luz

blanca, se contó el número de bandas (alelos) presentes en cada muestra y se asignó un número y una letra para cada una.

Interpretación de los zimogramas

El término zimograma se refiere a electromorfogramas revelados para enzimas específicas por medio de tinciones histoquímicas (Hunter y Market, 1957). Las bandas coloreadas o electromorfos son zonas de actividad enzimática.

En organismos cuyos fenotipos consistían de una sola banda, se consideraron homocigotos y heterocigotos a aquellos que dependiendo de la estructura cuaternaria de la enzima, presentan dos bandas para las monoméricas o tres para las diméricas (De la Rosa-Velez, 1986) (Figura 2).

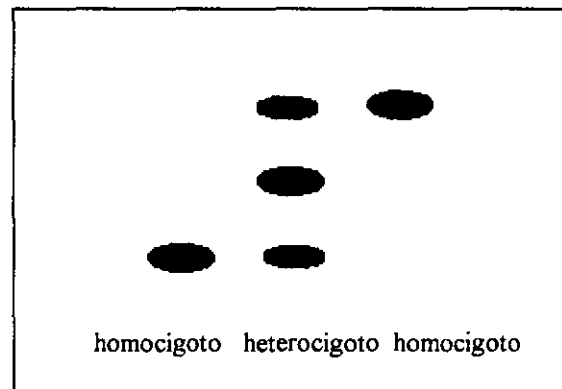


Figura 2. Diagrama de un genotipo homocigoto y un heterocigoto para una enzima dimérica (Tomado de Whitmore, D., 1990).

Procesamiento de datos

Los resultados obtenidos se capturaron en una base de datos utilizando el programa Lotus 1 2 3 versión 5.0; posteriormente fueron analizados con el programa (TFPGA versión 1.3 (Miller, Mark. 1997).

Con los datos obtenidos de los zimogramas se calcularon los siguientes estimadores genéticos:

1. **Frecuencias alélicas:** número de veces que se presenta un alelo entre el total del tamaño de muestra por dos para un determinado locus.
2. **Frecuencias genotípicas:** número de veces que se presentó un genotipo entre el número total de genotipos para un determinado locus.
3. **Número promedio de alelos por locus (n):** es la media del número de alelos por locus considerando todos los *loci* analizados.
4. **Heterocigosis:** se estimó en base a dos criterios:
 - a) **Heterocigosis observada promedio (H_o):** es el promedio de la heterocigosis obtenida a partir del total de genotipos heterocigotos entre el total de genotipos de cada locus de la muestra, para un determinado número de *loci* analizados.
 - b) **Heterocigosis esperada promedio (H_e):** se obtuvo a partir del total de genotipos heterocigotos entre el total de genotipos, asumiendo el equilibrio teórico de Hardy-Weinberg, el cual postula que el proceso de herencia por sí mismo no cambia las frecuencias alélicas, ni las frecuencias genotípicas de un locus dado, lo cual se da en poblaciones de tamaño grande, con sistema reproductivo panmítico (aleatorio) y en ausencia de mutación, migración, deriva o selección (Ayala y Kiger, 1984).

El cálculo de H_e se basó en las frecuencias genotípicas de equilibrio que están dadas por el cuadrado de las frecuencias alélicas, el cual (para dos alelos con frecuencias p y q) se representa en la siguiente ecuación:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Donde p_i fue la frecuencia del i ésimo alelo de k alelos para un locus determinado.

5. **Polimorfismo (P%)**: se define como la razón de *loci* polimórfico identificados y el total de *loci* analizados (Ayala y Kiger, 1984). Se tomó el criterio del 95%, esto es considerar un locus polimórfico si el alelo más común se presentó con una frecuencia mayor o igual a 0.95 (P_{95}).

6. **Bondad de ajuste de ji-cuadrada**: se utilizó para contrastar las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas utilizando la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k [(O_i - E_i)^2 / E_i]$$

Donde O_i es el i ésimo genotipo observado de k genotipos esperado en equilibrio de Hardy-Weinberg correspondiente al observado.

Los grados de libertad se obtuvieron de la siguiente manera:

$$g.l = \text{genotipos} - \text{alelos}$$

6. **Equilibrio de Hardy-Weinberg:** se realizaron pruebas de ajuste de Hardy-Weinberg, mediante pruebas de bondad de ajuste χ^2 ($\alpha \leq 0.05$), se analizaron las frecuencias genotípicas observadas bajo el modelo de Hardy-Weinberg.

Los estimadores genéticos mencionados anteriormente y el fenograma se obtuvieron mediante el programa TFGA versión 1.3 (Miller, Mark. 1997).

6.3 Aislamiento de ADN genómico

Se disectaron secciones de tejido de músculo aductor del organismo aún congelado. Las secciones de tejido se colocaron en tubos Eppendorf de 1.7 mL con 500 μL de tampón de lisis (Apéndice II) y 6.6 μg de Pronasa B (stock 1.33 mg/mL). Los tubos se incubaron a 45 °C en baño María durante dos horas, agitando en vortex cada 30 minutos; al término de una hora se agregaron 6.6 μg adicionales de la enzima repitiendo el paso anterior. Transcurrida la incubación se adicionó a cada tubo 500 μL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1); los tubos se agitaron por inversión hasta obtener una mezcla lechosa y se centrifugaron a 17 530 $\times g$ durante 10 minutos a 25 °C. De esta centrifugación se obtuvieron tres fases: una fase superior acuosa o sobrenadante que se utiliza para purificar ADN, una interfase que contiene el residuo celular y una fase orgánica en el fondo del tubo (las dos últimas fueron desechadas). El sobrenadante (500 μL) se transfirió a un tubo nuevo; para eliminar las trazas de cloroformo/alcohol isoamílico, los tubos se incubaron abiertos en baño María a 45 °C durante 15 minutos.

Para la precipitación del ADN genómico se adicionaron a cada tubo 2 volúmenes de etanol absoluto (1 mL) pre-enfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, los tubos se mezclaron por inversión y se dejaron precipitar toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente los tubos se centrifugaron a $17\ 530\ \text{x g}$ durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se decantó y al botón formado (ADN) se le hicieron tres lavados con etanol al 70% pre-enfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; finalmente se centrifugó a $17\ 530\ \text{x g}$ durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; se decantó el sobrenadante y los botones de ADN se dejaron secar al aire. El botón se disolvió en $200\ \mu\text{L}$ de TE-ARNAsa (Apéndice II) y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Para eliminar los restos de ARNAsa se realizó una segunda extracción con cloroformo/alcohol isoamílico siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado; el botón formado se disolvió en $200\ \mu\text{L}$ de TE.

La concentración y pureza del ADN se determinó a partir de la absorbancia 260 y 280 nm, según el método de Warburg-Christian (1941). La longitud de 260 nm detecta ácidos nucleicos y la de 280 proteínas, el cociente 260/280 es utilizado para evaluar la pureza del ADN. El valor considerado para un ADN puro es 1.8, valores por arriba de este sugieren una contaminación por ARN y por debajo una contaminación por proteínas (Turner *et al.*, 1998). Las preparaciones se llevaron a una concentración final de $100\ \text{ng}/\mu\text{L}$.

De cada preparación se realizó un análisis de ADN en geles de agarosa 0.8% y TBE 1X (Apéndice II). Una vez gelificado, el gel se sumergió en una cámara de electroforesis (WIDE MINI SUB CELL, BIO RAD) que contenía 500 mL de tampón TBE 1X. Se mezclaron $10\ \mu\text{L}$ de muestra y $2\ \mu\text{L}$ de tampón de carga (Apéndice II) y se cargaron los pozos del gel. La electroforesis se corrió a 70 V durante 15 minutos, para mantener el voltaje constante se utilizó una fuente de poder BIO RAD PAC 300; transcurrido el tiempo, se retiró el gel y se observó bajo luz UV, este se fotografio en un Fotodocumentador (UVI TEC).

6.4 RAPD (random amplification of polymorphic DNA)

Para llevar a cabo la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (por sus siglas en inglés **RAPD**) se realizó el siguiente procedimiento: en tubos Eppendorf de 1.7 mL se colocaron 100 μ L de ADN (de un stock 100 ng/ μ L) y 100 μ L de Quelex (Apéndice II), los tubos se incubaron en baño María a 56 °C durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se agitaron en un vortex 10 segundos, posteriormente se centrifugaron a 15 900 g durante 20 segundos a temperatura ambiente; los tubos se incubaron 8 minutos en un baño hirviendo y se agitaron 20 segundos en un vortex, finalmente fueron centrifugados a 15 900 g durante 3 minutos a temperatura ambiente (Walsh *et al.*, 1991). En tubos Eppendorf de 600 μ L se colocaron 2 μ L de ADN (preparados como se mencionó anteriormente), 1 μ L de oligo 10 nM (tabla 2), 2.5 μ L de tampón PCR 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 15 mM MgCl₂, 1 mg/mL gelatina), 1 μ L dNTP's 10 mM, 18.3 μ L de agua Mili Q estéril, 0.2 μ L de Taq polimerasa (1U) y 30 μ L de aceite mineral. Finalmente los tubos se colocaron en un Termociclador (Thechne Cyclogene) con el siguiente programa: 94° 2 min. (1 ciclo), 92° 1 min.; 35° 1.5 min.; 72° 1 min (40 ciclos) y un periodo de extensión final de 72° 3 min. (1 ciclo), 4° 10 min, (1 ciclo).

Los productos obtenidos del PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% en TBE 1X (Apéndice II) preteñidos con bromuro de etidio. De cada reacción se tomaron 25 μ L y se mezclaron con 5 μ L de tampón de carga (Apéndice II), como estándar para calcular el tamaño de los productos se utilizó el 1Kb DNA Ladder (LIFE TECHNOLOGIES); la electroforesis se corrió a 70 V durante 60 minutos, transcurrido el tiempo se observó bajo luz UV y los resultados fueron documentados en un Fotodocumentador UVI TEC.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificación RAPD

Oligos para amplificación RAPD	
No.	Secuencia 5' - 3'
5	GTCGCCGAC
6	GTAGACGAGC
7	AAACGTCGGG
8	ACTGACTGCC
9	GACTTTCGCA
10	CGCGAAGGAT
11	CCGAAAACGC
12	CGACCAGAGC
13	ATGGACACCA
22	TCACGGTGCA
23	GTCGCCGAC
27	GACTTTCGCA
28	CGCGAAGGAT
30	CGACCAGAGC
32	AGGGTTCTTG

Procesamiento de datos

Los resultados obtenidos se capturaron en una base de datos utilizando el programa Lotus 1 2 3 versión 5.0; posteriormente fueron analizados con el programa (TFPGA versión 1.3 (Miller, Mark. 1997); los estimadores calculados fueron los mismos que se utilizaron para los análisis enzimáticos.

El peso las bandas obtenidas se analizó con el programa UVIDOC.

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis enzimáticos

Una vez que se realizó la tinción específica para cada enzima se obtuvieron los electromorfogramas, en la figura (3a) se observan 8 carriles correspondientes a organismos heterocigotos de B. Concepción para la enzima Esterasa; la figura (3b) ejemplifica 9 organismos heterocigotos de Ecuador para la Fosfatasa alcalina; (figura 3c) 8 organismos homocigotos de Guaymas para la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; (figura 3d) 9 organismos heterocigotos de San Ignacio para la enzima Lactato deshidrogenasa y la figura 3e, 8 organismos heterocigotos de B. de La Paz para la enzima Superóxido dismutasa.

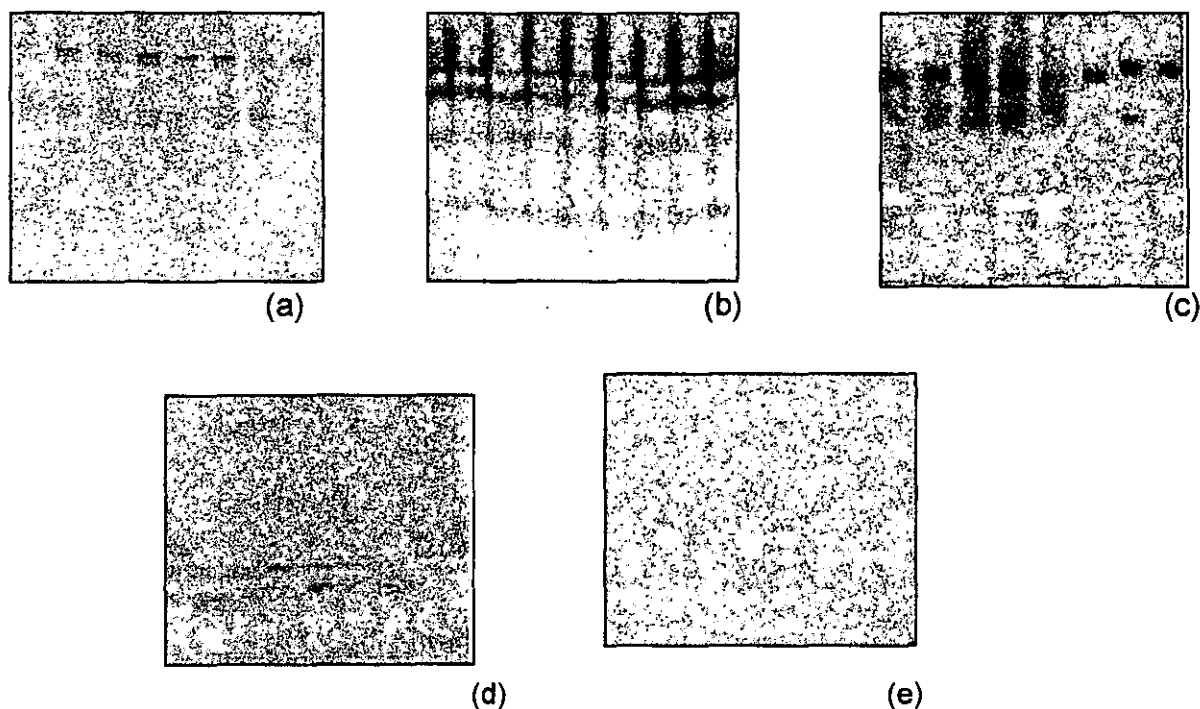


Figura. 3. Electromorfos generados al utilizar cinco sistemas enzimáticos. a) Esterasa (EST), b) Fosfatasa alcalina (ALP), c) Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa (G6PDH), d) Lactato deshidrogenasa (LDH) y e) Superóxido dismutasa(SOD).

De los cinco sistemas enzimáticos analizados en este estudio se revelaron 9 loci para las poblaciones de *A. ventricosus* (Tabla 2).

Tabla 2. Número de *loci* analizados con cinco sistemas enzimáticos

Sistemas Enzimáticos	*Codigo y abreviatura	Locus	Estructura cuaternaria de la enzima
Esterasa	3.1.1.1 EST	2	Monomérica
Fosfatasa Alcalina	3.1.3.1 ALP	1	Dimérica
Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa	1.1.1.49 G6PDH	2	Dimérica
Lactato Deshidrogenasa	1.1.1.27 LDH	2	Dimérica
Superoxido Dismutasa	1.15.1.1 SOD	2	Dimérica

*Nombre y código de la enzima establecidos por la Comisión de Enzimas (E.C.) del Comité de Nomenclatura para la Unión Internacional de Bioquímica (1984).

Las frecuencias alélicas de los *loci* observados se presentan en la Tabla 3. En la población de Guaymas fueron polimórficos los *loci* (EST-1, EST-2, G6PDH-1, SOD-1 y SOD-2) y monomórficos (G6PDH-2 y LDH-2); Bahía Concepción presentó 5 *loci* polimórficos (EST-2, ALP-1, G6PDH-2, SOD-1 y SOD-2) y un monomórfico (LDH-2); para Bahía de La Paz se presentaron cinco *loci* polimórficos (EST-1, EST-2, G6PDH-2, SOD-1 y SOD-2) y dos monomórficos (LDH-2); en la población de Laguna San Ignacio fueron polimórficos los *loci* (EST-1, EST-2, ALP-1, LDH-1, LDH-2, y SOD-2) y monomórficos (G6PDH-2); en la población de Bahía Magdalena se identificaron dos *loci* monomórficos (G6PDH-1 y LDH-2) el resto de los *loci* para esta población fueron polimórficos; en la población de Ecuador se identificaron como *loci* monomórficos (EST-1, EST-2, ALP-1, G6PDH-1 y G6PDH-2) y polimórficos (LDH-1, SOD-1 y SOD-2); cabe señalar que el locus SOD-1 y SOD-2 fueron polimórficos para todas las poblaciones estudiadas.

Tabla 3. Frecuencias alélicas para seis poblaciones naturales de *A. ventricosus*.

Locus	Alelos	Guaymas	Bahía Concepcion	Bahía de La Paz	Laguna San Ignacio	Bahía Magdalena	Ecuador
EST-1	A	0.566*	0.500	0.789*	0.867*	0.500	1
	B	0.433	0.500	0.211	0.133	0.500	-
EST-2	A	0.551*	0.950*	0.425*	0.286*	1	-
	B	0.448	0.050	0.575	0.714	-	1
ALP-1	A	0.500	0.700	0.500	0.519*	0.937*	1
	B	0.500	0.300	0.500	0.481	0.063	-
G6PDH-1	A	0.483*	0.500	-	0.500	1	1
	B	0.517	0.500	-	0.500	-	-
G6PDH-2	A	1	0.200	0.714*	-	0.500	1
	B	0	0.800	0.286	1	0.500	-
LDH-1	A	0.500	0.500	0.500	0.618*	0.875*	0.914*
	B	0.500	0.500	0.500	0.382	0.125	0.086
LDH-2	A	1	-	-	0.263*	1	-
	B	0	1	1	0.737	-	-
SOD-1	A	0.717*	0.650*	0.750*	0.500	0.625*	0.931*
	B	0.283	0.350	0.250	0.500	0.375	0.069
SOD-2	A	0.966*	0.100*	0.500	0.605*	0.375*	0.862*
	B	0.033	0.900	0.500	0.395	0.625	0.138

* locus polimórfico

(-) ausencia de alelos

En la Tabla 4 se muestra un resumen de la variabilidad genética obtenida en las poblaciones naturales de almeja catarina. La variabilidad fué baja teniendo valores promedio de 1.56 a 1.78 de alelos por locus, el porcentaje de loci polimórficos (P%) fue de 50.00 a 88.88, el polimorfismo por población se calculó aplicando el criterio del 95% en el cual la presencia del alelo más común se encuentra en frecuencias menores o iguales a 0.95.

Tabla 4. Resumen de la variabilidad genética en poblaciones naturales de *A. ventricosus*. (N) es el número de organismo estudiados por población, (L) el número de loci, (n) número promedio de alelos por locus, (He) promedio de heterozigosis esperada por locus, (Ho) promedio de heterozigosis observada por locus, (P%) porcentaje de loci polimórficos (criterio 0.95)

	Guaymas	Bahía Concepción	Bahía de La Paz-	Laguna San Ignacio	Bahía Magdalena	Ecuador
N	30	10	28	30	8	30
L	9	9	8	9	9	8
n	1.88	1.88	1.87	1.77	1.68	1.37
He	0.3343	0.3506	0.3966	0.3940	0.2719	0.1303
Ho	0.4889	0.4889	0.3714	0.4435	0.3472	0.1638
P% (.95)	66.66	88.88	87.50	88.88	66.66	50.00

Con los electromorfos obtenidos en cada organismo de las poblaciones estudiadas se obtuvo un fenograma; (figura 4), en el se pueden identificar cinco grupos. El grupo I que agrupa a una distancia de 0.1042 las poblaciones de Laguna San Ignacio y Ecuador; el grupo II que agrupa a una distancia de 0.1725 las poblaciones de Bahía Concepción y Bahía de La Paz, el grupo tres que agrupa a una distancia de 0.2560 las poblaciones de Bahía Concepción, Bahía de La Paz, Laguna San Ignacio y Ecuador; el grupo cuatro que agrupa a una distancia de 0.1498 las poblaciones de Guaymas y Bahía Magdalena y el grupo cinco que agrupa a una distancia 0.4297 las poblaciones de Guaymas, Bahía Concepción, Bahía de La Paz, Laguna San Ignacio, Bahía Magdalena y Ecuador.

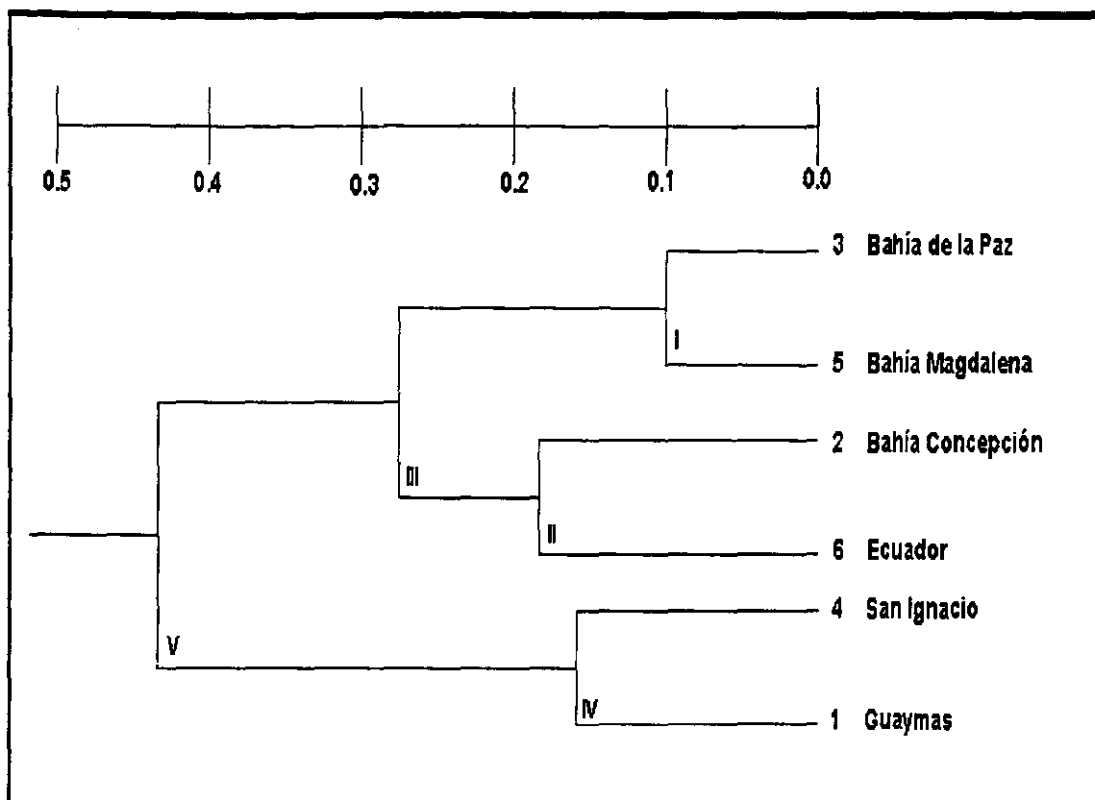


Figura 4. Fenograma obtenido al analizar cinco sistemas enzimáticos (EST, ALP, G6PD, LDH y SOD).

7.2 Análisis de ADN

Los extractos obtenidos en las muestras de almeja catarina fueron de buena calidad para las seis poblaciones estudiadas (Guaymas, Bahía Concepción, Bahía de La Paz, Laguna San Ignacio, Bahía Magdalena y Ecuador). En la figura 5 se observa una fotografía del ADN extraído de buena calidad. Los extractos obtenidos fueron utilizados como templado para preparar las reacciones de RAPD mediante PCR.

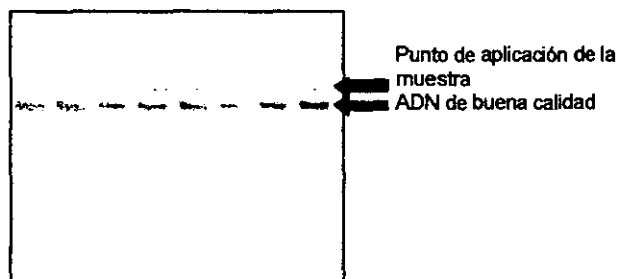


Figura 5. Electroforesis de ADN genómico: ADN de buena calidad,

7.3 Análisis de RAPD

Los resultados obtenidos mediante **RAPD** muestran que en los organismos utilizados en este estudio solo amplificaron con los oligonucleótidos 28 y 30 (2 de 15 probados), rindiendo patrones electroforéticos definidos para las localidades estudiadas.

De los oligonucleotidos utilizados en este estudio, sólo 2 de 15 amplificaron en las poblaciones estudiadas, revelando un total 23 *loci* para ambos oligos (tabla 6)

Tabla 5. Número de loci analizados con los oligonucleotidos 28 y 30.

Oligonucleotido	Secuencia 5' - 3'	No. de <i>loci</i>
28	CGCGAAGGAT	14
30	AGGGTTCTTG	9

Las frecuencias alélicas de los loci observados mediante el uso de RAPDs se presentan en la Tabla 7. En la población de Guaymas fueron polimórficos para el oligo 28 los *locus* f1, h1, j1 y para el oligo 30 h1; mientras que en la población de Bahía Concepción no se presentó un *locus* polimórfico, siendo monomórficos los *locus* a1, b''1, d'1, e1, f1, g1, h1, i1, j1 para el oligo 28 y a1, c'1, e1, f1, g1, h1 para el oligo 30, para Bahía de La Paz fueron polimórficos los *locus* a1, c'1, d1, g1 y h1 para el oligo 28, mientras que fueron monomórficos los *locus* b1, b''1, c1, d'1, e1, f1, i1, j1 para el oligo 28 y e1, f1, g1 para el oligo 30; Bahía Magdalena presentó los *locus* monomórficos b1, b''1, c1, d1, d'1 g1, h1, i1 y j1 para el oligo 28 y a1 para el oligo 30.

Tabla 6. Frecuencias alélicas para seis poblaciones naturales de *A. ventricosus* obtenidas mediante RAPDs con los oligonucleótidos 28 y 30.

Locus	Alelos	Guaymas	Bahía Concepción	Bahía de La Paz	Laguna San Ignacio	Bahía Magdalena	Ecuador
Oligo 28							
a1	a	0.1056	-	0.0180	0.0513	0.0646	0.4226
	b	0.8944	1.0	0.9820*	0.9487	0.9354	0.5774
b1	a	0.3675	0.1056	-	0.5918	1	0.5918
	b	0.6325	0.8944	1	0.4082	-	0.4082
b'1	a	0.1633	0.2254	-	0.2929	0.0646	0.2042
	b	0.8367	0.7746	1	0.7071	0.9354	0.7958
b''1	a	0.1633	-	-	0.0168	-	0.1437
	b	0.8367	1.00	1	0.9832	1	0.8563
c1	a	0.0871	0.2254	-	0.1437	1	0.4836
	b	0.9129	0.7756	1	0.8563	-	0.5164
c'1	a	0.1835	0.1633	0.0364	0.3339	-	0.4523
	b	0.8165	0.8367	0.9636*	0.9661	1	0.5477
d1	a	0.2472	0.1633	0.0180	0.1437	1	0.2254
	b	0.7528	0.8367	0.9820*	0.8563	-	0.7756
d'1	a	0.1633	-	-	0.0339	-	0.0339
	b	0.8367	1	1	0.9661	1	0.9661
e1	a	0.2042	-	-	0.2697	0.0646	0.2254
	b	0.7958	1	1	0.7303	0.9354	0.7746
f1	a	0.0339	-	-	0.3675	0.0646	0.3675
	b	0.9661*	1	1	0.6325	0.9354	0.6325
g1	a	0.0513	-	0.0180	0.0339	-	0.2472
	b	0.9487	1	0.9820*	0.09661	1	0.7528
h1	a	0.0339	-	0.0180	0.01668	-	0.1633
	b	0.9661*	1	0.9820*	0.9832	1	0.8367
i1	a	0.0168	-	-	0.0339	-	0.1633
	b	0.9832	1	1	0.9661	1	0.8367
j1	a	0.0168	-	-	0.0339	-	0.1056
	b	0.9832*	1	1	0.9661	1	0.8944

continuación de la Tabla 6.

Loci	Alelos	Guaymas	Bahía Concepción	Bahía de la Paz	Laguna san Ignacio	Bahía Magdalena	Ecuador
Oligo 30 a1	a	0.1244	-	0.2208	0.0871	-	0.1633
	b	0.8756	1	0.7792	0.9129	1	0.8367
b1	a	0.3945	0.0513	0.1762	0.1244	0.2094	0.6349
	b	0.6055	0.9487	0.8338	0.8756	0.7906	0.3651
c1	a	0.3675	0.0513	0.0742	0.2254	0.2929	0.4523
	b	0.6325	0.9487	0.9258	0.7756	0.7071	0.5477
c'1	a	0.2554	-	0.1548	0.1633	0.2929	0.2929
	b	0.7756	1	0.8452	0.8367	0.7071	0.7071
d1	a	0.1244	0.1633	0.1340	0.1056	0.134	0.3169
	b	0.8756	0.8367	0.8660	0.8944	0.866	0.6831
e1	a	0.1633	-	-	0.2472	0.3876	0.4226
	b	0.8367	1	1	0.7528	0.6124	0.5774
f1	a	0.1633	-	-	0.1835	0.2094	0.4523
	b	0.8367	1	1	0.8165	0.7906	0.5477
g1	a	0.1835	-	-	0.0871	0.2094	0.1244
	b	0.8165	1	1	0.9129	0.7906	0.8756
h1	a	0.0168	-	0.0180	0.0871	0.0646	0.1056
	b	0.9832	1	0.9820	0.9129	0.9354	0.8944

(*) locus polimórfico

(-) ausencia de alelos

En la Tabla 7 se muestra un resumen de la variabilidad genética obtenida mediante RAPDs en las poblaciones estudiadas de almeja catarina. La variabilidad genética obtenida fue baja presentando valores promedio de 1.35 a 2.05 de alelos por locus, el porcentaje de loci polimórficos (P%) fue de 21.73 a 95.65; éste se calculó al igual que las aloenzimas aplicando el criterio del 95% .

Tabla 7. Resumen de la variabilidad genética en poblaciones naturales de *A. ventricosus*, (N) es el número de organismo estudiados por población, (L) el número de loci, (n) número promedio de alelos por locus, (He) promedio de heterozigosis esperada por locus, (Ho) promedio de heterozigosis observada por locus, (P%) porcentaje de *loci* polimórficos (criterio 0.95)

	Guaymas	Bahía Concepción	Bahía de La Paz-	Laguna San Ignacio	Bahía Magdalena	Ecuador
N	30	10	28	41	8	30
L	23	23	23	23	23	23
n	1.99	1.35	1.48	2.05	1.52	1.99
He	0.2446	0.0870	0.0670	0.2174	0.1453	0.3689
Ho	0.2405	0.0827	0.0658	0.2130	0.1362	0.3628
P% (.95)	78.26	34.78	21.73	69.56	52.1739	95.65

Con los electromorfos obtenidos en cada organismo de las poblaciones estudiadas se obtuvo un fenograma (figura 6), en el cual se pueden identificar cinco grupos. El grupo I que agrupa a una distancia de 0.0113 las poblaciones de Bahía de La Paz y Bahía Concepción, y Ecuador; el grupo II que agrupa a una distancia de 0.0216 poblaciones de Laguna San Ignacio y Guaymas, el grupo tres que agrupa a una distancia de 0.3006 las poblaciones de Laguna San Ignacio, Bahía de La Paz, Bahía Concepción y Guaymas, el grupo cuatro que agrupa a una distancia de 0.0795 las poblaciones de Laguna San Ignacio, Bahía de La Paz, Ecuador, Bahía Concepción y Guaymas y el grupo cinco que agrupa a una distancia de 0.1276 las poblaciones de Bahía Magdalena, Laguna San Ignacio, Bahía de La Paz, Ecuador, Bahía Concepción y Guaymas (figura 6).

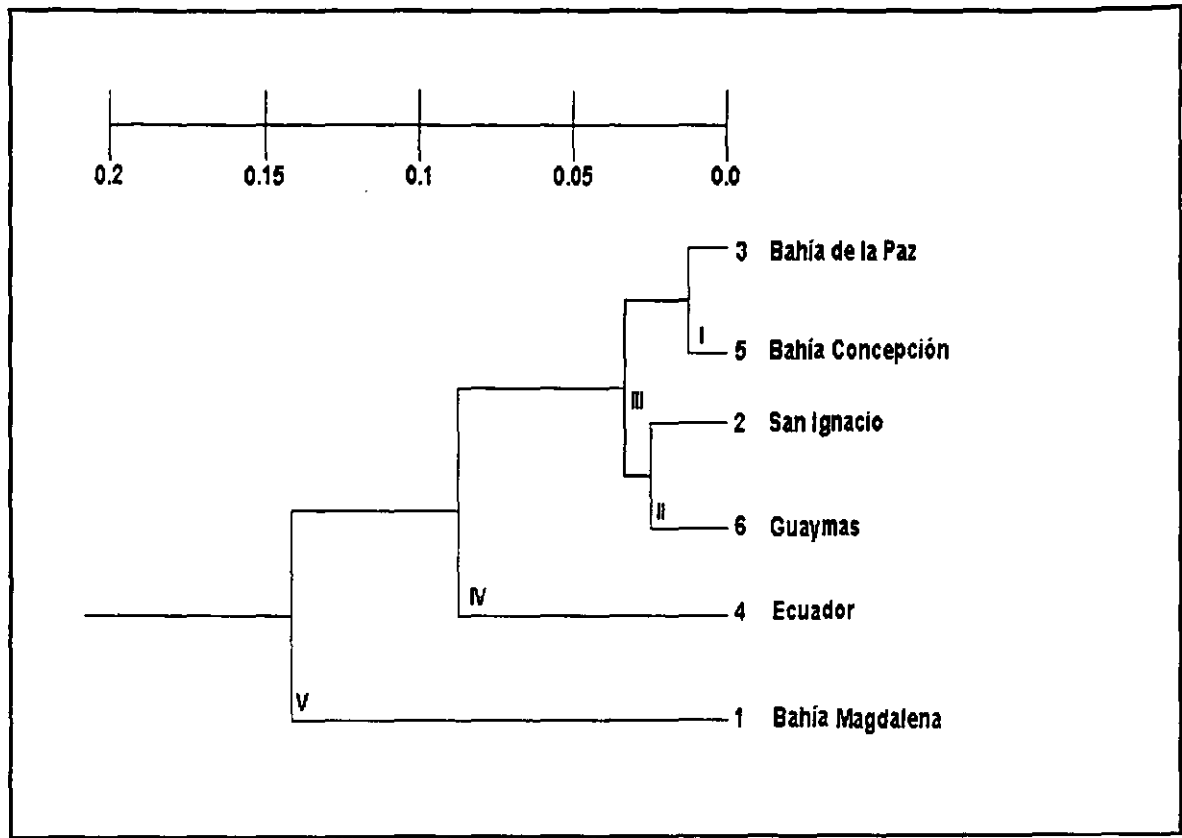


Figura. 6. Fenograma obtenido al analizar los oligonucleotidos 28 y 30.

Con los patrones electroforéticos que se obtuvieron con la amplificación de los oligos 28 y 30, fué posible identificar una(s) banda común (s), presente(s) en las poblaciones naturales de almeja catarina. (Figuras 7-12); estas bandas comunes presentes en cada una de las poblaciones se pueden tomar como marcadores genéticos especie-población.

7.3.1 Guaymas

Con lo que respecta a los organismos de Guaymas el patrón electroforético observado con el oligo 28 mostró una banda conservada de 1.21 Kb (figura 7a), mientras que con el oligo 30 se presentó una banda común de 1.56 Kb (figura 7b).

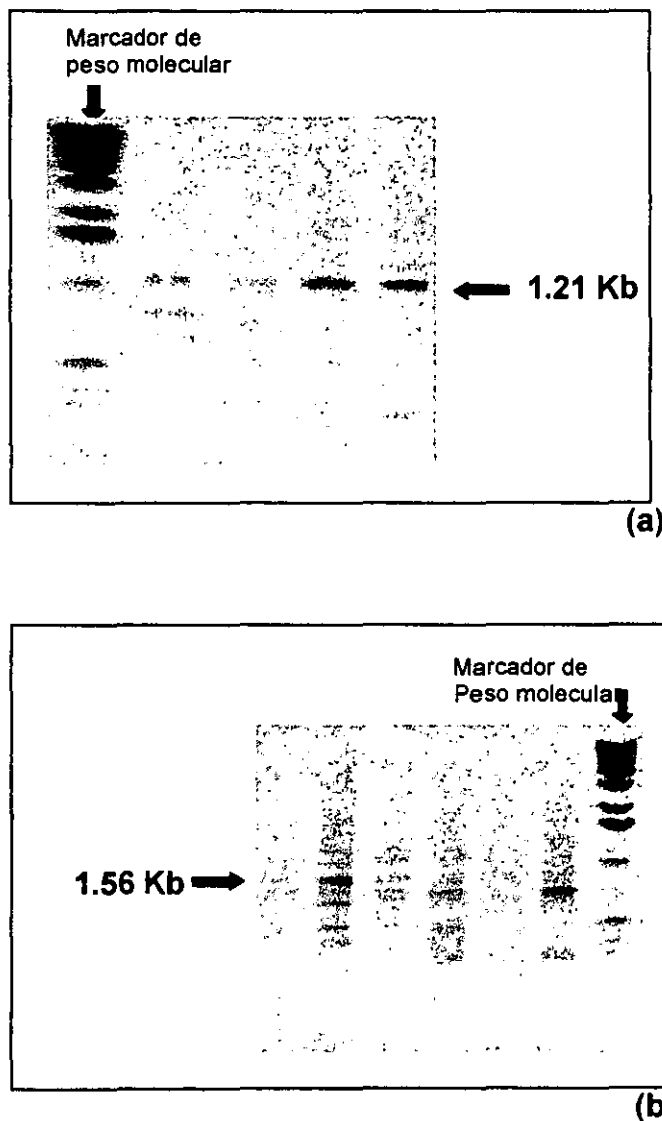


Figura. 7. Bandas conservadas en la población de Guaymas utilizando los oligos 28 (a) y 30 (b), cada carril ejemplifica un organismo de la población estudiada.

7.3.2 Bahía Concepción

En los organismos provenientes de Bahía Concepción como se puede observar (fig. 8a) el patrón electroforético obtenido con el oligo 28 fue muy parecido entre los organismos y se observó una banda conservada de 0.47 Kb. Por otra parte utilizando el oligo 30 se generó una banda de 0.24 Kb (fig. 8b),

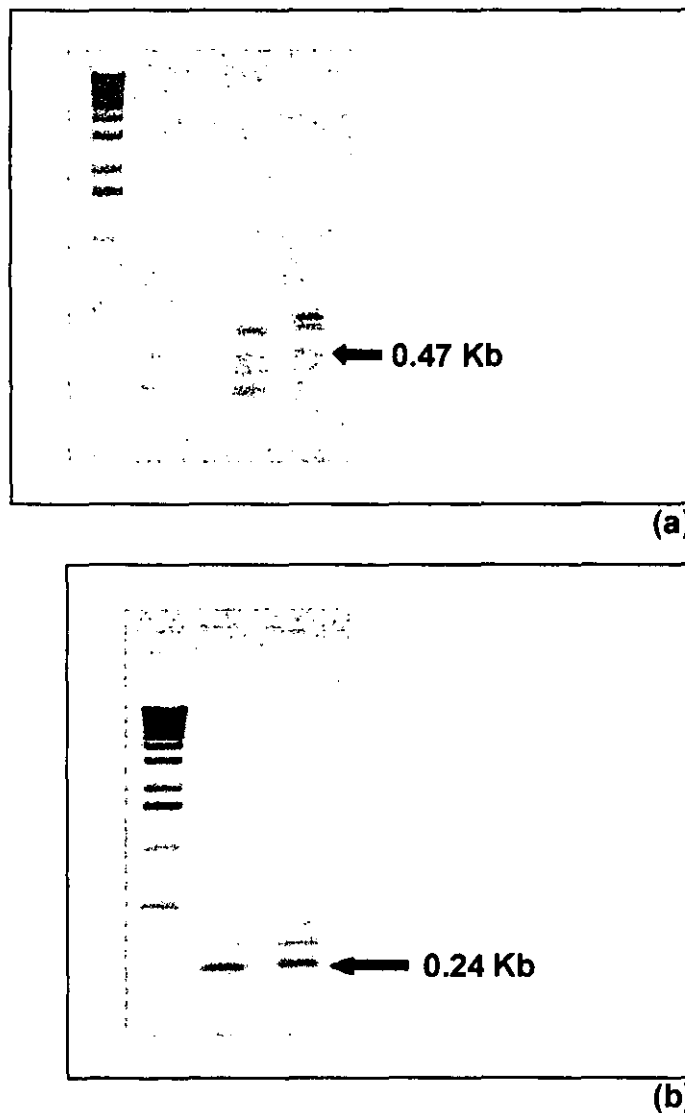


Figura 8. Bandas conservadas en la población de Bahía Concepción utilizando los oligos 28 (a) y 30 (b), cada carril ejemplifica un organismo de la población estudiada.

7.3.3 Bahía de La Paz

En cuanto a los organismos de la Bahía de La Paz el primer 28 no generó un patrón electroforético (fig. 9a), mientras que con el oligo 30 se obtuvo un patrón con el cual se observó una banda de 1.95 Kb (fig. 9b).

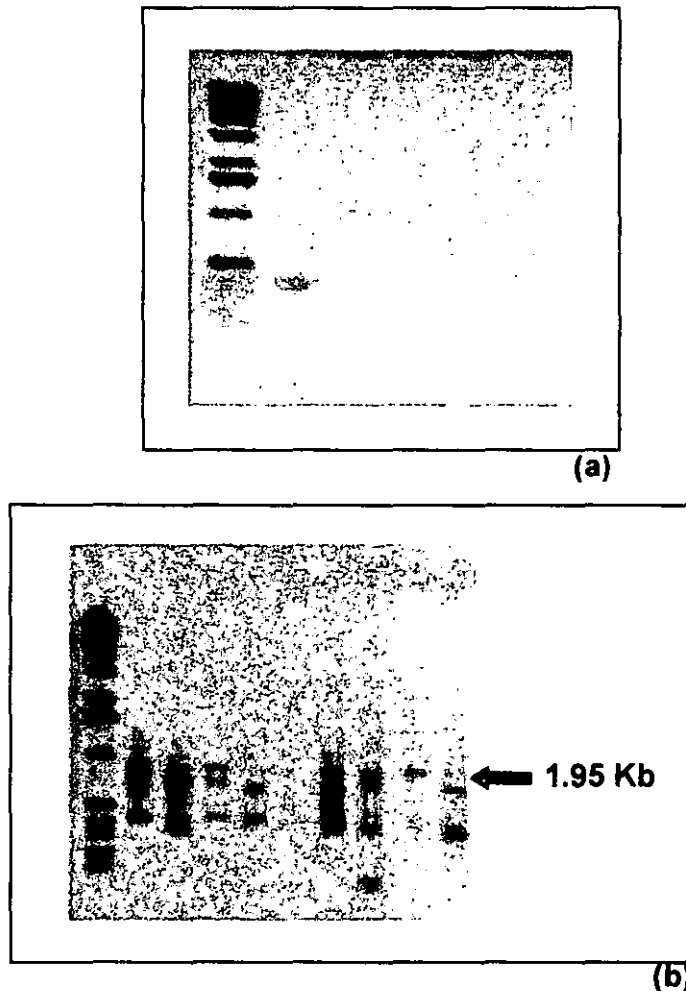


Figura. 9. Bandas conservadas en la población de Bahía de La Paz utilizando los oligos 28 (a) y 30 (b), cada carril ejemplifica un organismo de la población estudiada.

7.3.4 Laguna San Ignacio

Los organismos de la Laguna San Ignacio analizados con el oligo 28 mostraron un patrón electroforético bien definido teniendo una banda común de 1.018 Kb (figura 10a) que se conserva en la población, no obstante el patrón resultante con el oligo 30 permitió obtener una banda de 0.47 Kb (figura 10b).

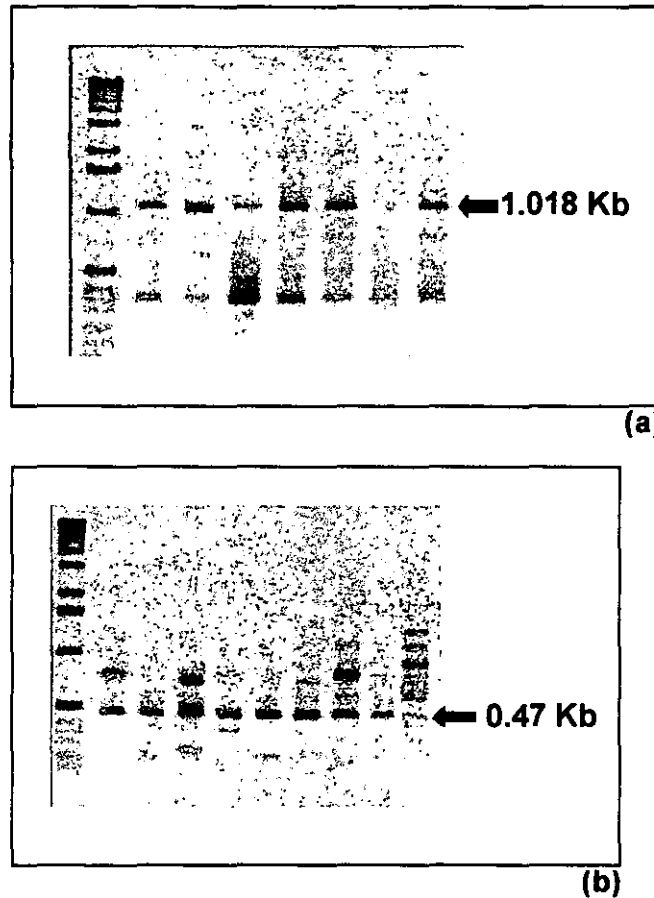


Figura 10. Bandas conservadas en la población de San Ignacio utilizando los oligos 28 (a) y 30 (b), cada carril ejemplifica un organismo de la población estudiada.

7.3.5 Bahía Magdalena

Los organismos pertenecientes a Bahía Magdalena mostraron un patrón electroforético muy homogéneo (figura 11a), siendo posible identificar dos bandas conservadas para la población utilizando el oligo 28; la de mayor tamaño correspondió a 1.07 Kb y la de menor tamaño a 0.77 Kb.

Utilizando el oligo 30 el patrón varió en cada uno de los organismos, por lo que sólo fue posible observar una banda común para dicha población con un tamaño 0.51 Kb (figura 11b).

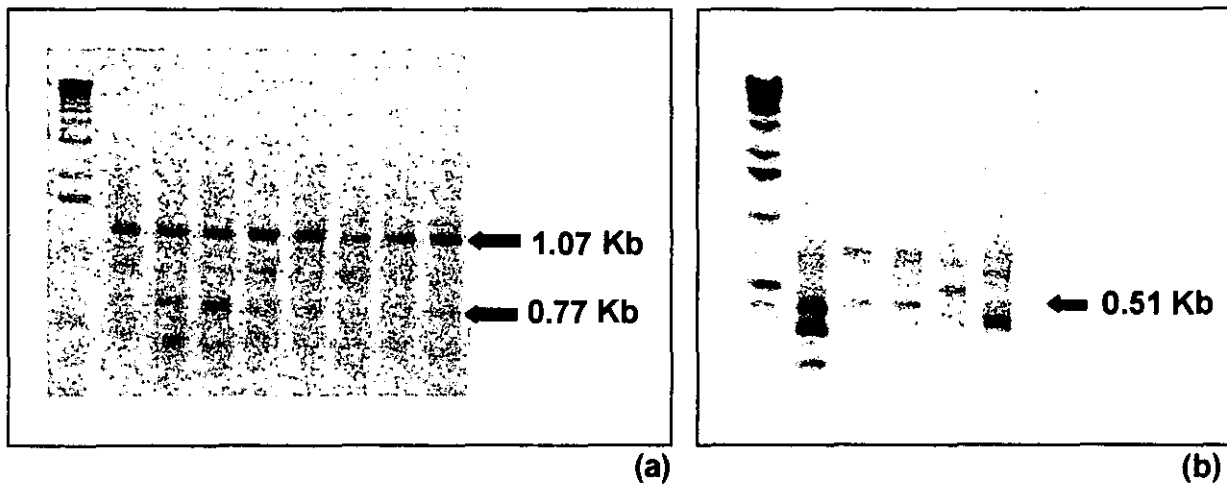


Figura 11. Bandas conservadas en la población de Bahía Magdalena utilizando el Oligo 28 (a) y 30 (b), , cada carril ejemplifica un organismo de la población estudiada.

7.3.6 Ecuador

Con respecto a los organismos pertenecientes a Ecuador, estos mostraron un patrón electroforético muy claro y definido utilizando el oligo 28. Se pudo observar que la banda común presente en dicha población fue de 1.19 Kb (figura 12a), mientras que el tamaño de la banda para el oligo 30 fué de 0.76 Kb (figura 12b).

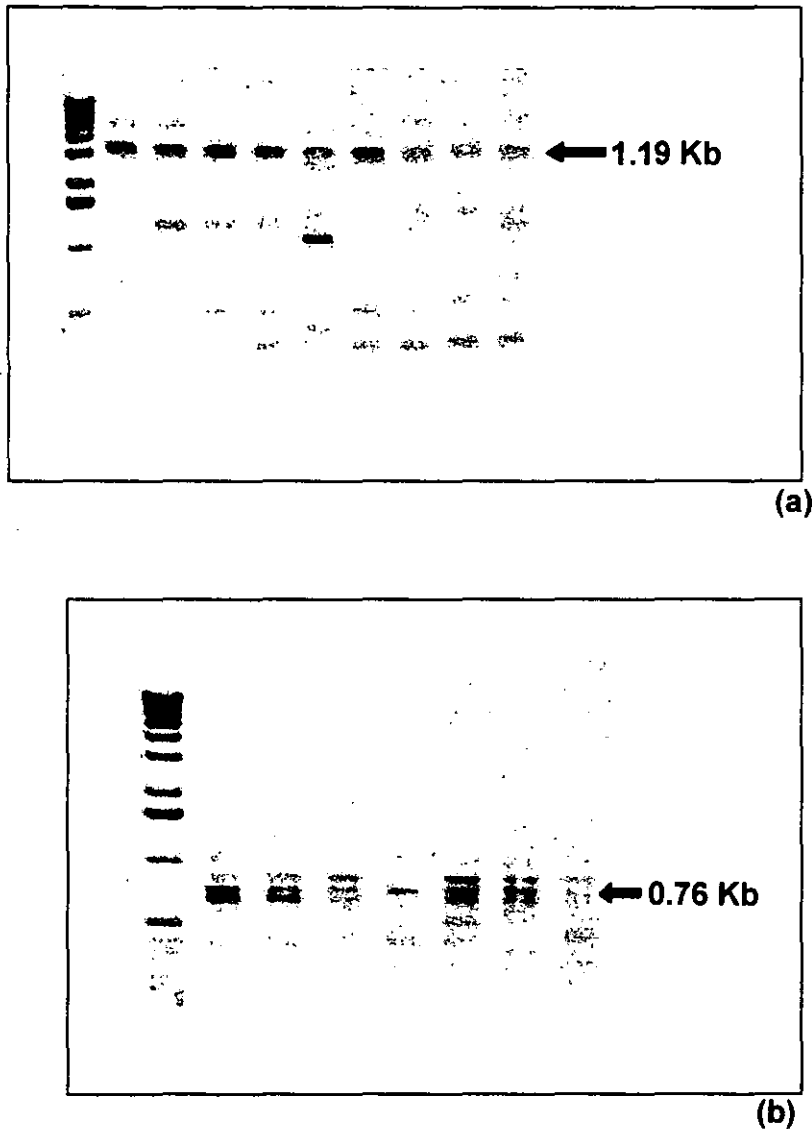


Figura 12. Bandas conservadas en la población de Ecuador utilizando el Oligo 28 (a) y 30 (b), cada carril ejemplifica un organismo de la población estudiada.

VIII. DISCUSIÓN

Los estudios de genética de poblaciones, permiten conocer la magnitud de la variabilidad genética de la población (Dobzhansky *et al.*, 1980). En la actualidad existen diferentes técnicas para monitorear la variabilidad genética en plantas y animales, entre las más comúnmente utilizadas se encuentran los análisis con isoenzimas y RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). Dobzhansky *et al.*, (1980) menciona que las técnicas de electroforesis permiten la detección de variantes alélicas en genes individuales, constituyendo un medio útil para estimar la variabilidad en poblaciones naturales; de esta manera la aplicación de electroforesis en gel y el revelado de alelozimas mediante técnicas histoquímicas, han probado ser exitosas para la medición de la variabilidad genética en poblaciones naturales (Lewontin y Hubby, 1966), ya que los fenotipos obtenidos se pueden igualar con los genotipos, permitiendo enumerar las frecuencias genéticas y detectar proteínas variables y no variables.

En el presente estudio, el cual analiza por primera vez la variabilidad genética en poblaciones naturales de *Argopecten ventricosus*, se analizaron los siguientes marcadores genéticos EST, ALP, G6PDH, LDH y SOD, evidenciándose nueve *loci*, de los cuales el locus SOD-2 fue polimórfico para las seis poblaciones estudiadas, el número de alelos revelado para cada *locus* fue de dos (Tabla 2).

Los resultados obtenidos en este estudio revelan que el polimorfismo promedio encontrado en *A. ventricosus*, utilizando el criterio del 95% la variabilidad genética estimada en las poblaciones estudiadas fue de 50.00 a 88.88 (Tabla 4). Aunque este valor está próximo al promedio general de polimorfismo estimado para invertebrados marinos (58.7) Maynard (1989), es superior a los niveles de polimorfismo que generalmente se encuentran en el phylum mollusca (25-50%) (Cervantes-Franco, 1994), el polimorfismo promedio obtenido en las poblaciones estudiadas tiende al límite superior.

A nivel intrapoblacional los niveles mayores de polimorfismo se observaron entre las poblaciones de Bahía Concepción, Laguna San Ignacio y Bahía de La Paz, seguidas por las poblaciones de Guaymas, Bahía Magdalena y Ecuador.

El polimorfismo (P%) tomado como medida de variabilidad genética tiene un alcance limitado debido a dos problemas fundamentales (Ayala y Kiger, 1984). El primero se relaciona para definir si un locus es o no polimórfico. En general se manejan dos criterios: 1) con uno de ellos se considera a un locus polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no es superior a 0.99 (P_{99}); con el segundo se considerará a un locus polimórfico sólo cuando dicha frecuencia no supera el 0.95 (P_{95}).

El segundo problema se debe a que tanto *loci* ligeramente polimórficos como los altamente polimórficos tienen el mismo peso. Lo anterior no permite que se tenga la objetividad requerida para realizar un análisis profundo de la variabilidad genética de una población sólo en base a esta medida (Rosa-Velez y Rodríguez-Romero, 1989).

Los niveles de polimorfismo enzimático son evidentemente sensibles frente a algunos otros factores distintos a la selección. En las poblaciones con sistemas reproductores que favorecen la autofecundación o que presentan proporciones inusuales de apareamiento la variabilidad genética puede ser más baja.

Por otro lado la heterocigosidad de una población es la medida de la variación genética preferida por la mayoría de los genetistas de poblaciones. La heterocigosis esperada, calculada a partir de las frecuencias alélicas de las poblaciones mediante la ecuación de Hardy-Weinberg, se considera como la mejor medida de la diversidad porque estima la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (cada gameto de un individuo diferente lleva un alelo en

cada locus que puede ser considerado como muestreado al azar de la población) (Ayala y Kiger, 1984).

En este estudio la heterocigosis promedio observada fue mayor que la esperada en las poblaciones estudiadas de *A. ventricosus* de Bahía de La Paz (0.3966) presentandose un exceso de organismos heterocigotos, mientras que en el resto de las poblaciones se observó una deficiencia de heterocigotos, este tipo de deficiencias ha sido mencionado en otras especies del género *Brachidontes*, *Crassostrea*, *Macoma*, *Modiolus* y *Mytilus* (Zourus y Foltz, 1984) y en algunas especies como *Crassostrea virginica* (De la Rosa-Velez, 1986), *Modiolus capax* (Cervantes-Franco, 1984) entre otros. Sin embargo, las H_e fueron superiores al promedio general reportado para invertebrados marinos ($H_e=0.100$) (Maynard, 1989) e incluso mayores que al promedio general de gasteropodos y bivalvos ($H_e=0.170$) (Cervantes-Franco, A. 1994).

La presencia de un exceso de organismos heterocigotos, puede estar relacionado probablemente con los mecanismos de respuesta adaptativos de los organismos al medio ambiente que habitan, puesto que tanto las poblaciones localizadas en el Pacífico (Bahía Magdalena, Laguna San Ignacio y Ecuador) como las que se encuentran en el Golfo de California (Guaymas, Bahía Concepción y Bahía de La Paz) se localizan en zonas altamente productivas, así mismo las corrientes y vientos presentes en estas zonas favorecen la dispersión de las larvas de almeja catarina evitando de esta forma un proceso de endogamia.

Sin embargo, el estimador de heterocigosis, es muy sensible al número de *loci* analizados y en menor grado al número de organismos estudiados, Nei (1987) menciona que teóricamente la heterocigosis promedio sólo puede ser estimada cuando el número de *loci* analizados es grande debido a que en casi todas las poblaciones naturales la variación que se da en la heterocigosis en un

solo *locus* y entre *loci* es muy grande. No obstante, el número de *loci* analizados en este estudio (9) es menor a los 29 *loci* manejados por Ahmad *et al* (1977), pero se encuentra en el intervalo de 6 a 15 que es el más frecuentemente utilizado en estudios de variabilidad genética en bivalvos.

En este trabajo los resultados obtenidos mediante análisis enzimáticos mostraron que los sistemas utilizados (EST y SOD) presentaron un mayor número de *loci* polimórficos que los demás sistemas utilizados, por ende resultan adecuados para monitorear la variabilidad genética en las poblaciones de *A. ventricosus*. La actividad enzimática que se observó en los diferentes sistemas de tinción fué diferente, ya que unas enzimas se expresan más que otras, siendo la SOD la que mostró mayor actividad, seguida de la EST. Considerando que los zimogramas con los sistemas SOD y EST fueron bien diferenciados, es recomendable utilizar esta combinación en estudios posteriores, en virtud de que su utilización permitió caracterizar y personalizar cada población. Otros sistemas enzimáticos que pueden dar buenos resultados para otras especies de moluscos bivalvos son: la AAT (Aspartato Amino Transferasa), IDH (Isocitrato Deshidrogenasa), MDH (Malato Deshidrogenasa), ME (Enzima Malica) entre otras, ya que han sido utilizados con éxito en estudios en el monitoreo de la variabilidad genética en diversas especies como por ejemplo: *Crassostrea virginica* (De la Rosa-Velez, 1986) y en especies del género *Flexopecten* (Ríos *et al.*, 1999).

Las técnicas histoquímicas son de gran utilidad para estudios de variabilidad genética, aunque presenta limitaciones, Lewontin (1974) considera que aunque ningún estudio de variación está exento de dificultades y desviaciones, se pueden lograr estimaciones confiables de variación genética si se cumplen los siguientes requisitos: a) un tamaño adecuado de muestras, lo suficientemente grande para estudiar por lo menos 50 genomas, b) que los genomas provengan de poblaciones naturales, c) una muestra amplia de *loci*, en virtud de las diferencias considerables

en heterocigosis entre diferentes *loci*; d) una muestra diversa de *loci*, no ponderada importantemente por una o dos funciones enzimáticas y e) una muestra no desviada de *loci* es decir, sin elección conciente en función de su variabilidad conocida.

Finalmente, la aplicación de la técnica de zimogramas en el monitoreo de la variabilidad genética de una población y los datos que esta aporta se pueden utilizar como herramienta en la determinación del origen de captura de este recurso sujeto a veda por lo que es necesario coordinar esfuerzos con el CRIP o las autoridades competentes para que durante las evaluaciones demográficas de las poblaciones naturales sujetas a pesca comercial con las que finalmente se determinan las cuotas de captura en cada temporada. Sería necesario realizar muestreos en los que se colectaran no menos de 30 individuos, para obtener información acerca de la variabilidad genética de la población e incluso utilizarse como prueba para determinar el origen del recurso mediante la determinación y comparación de las frecuencias

En la actualidad existen métodos de biología molecular que permiten monitorear la variabilidad genética de diferentes especies que no requieren un gran número de muestras, como lo es la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), para llevar a cabo este método sólo se requiere de un buen extracto de ADN o en su defecto parcialmente degradado.

Las propiedades físicas y químicas que posee el ADN permiten que pueda ser separado y purificado haciendo posible realizar una extracción de buena calidad la mayoría de las veces tal como se observó en los organismos de las poblaciones de Bahía de La Paz, Bahía Concepción, Bahía Magdalena, San Ignacio, Guaymas y Ecuador.

En el laboratorio de Genética Molecular del CIBNOR, se ha observado que aunque las muestras presenten un aspecto fresco (por ejemplo productos enhielados como los que se ofrecen en los mercados para venta al público) al llevarse a cabo la extracción y análisis de los ácidos nucleicos estos presentan ya un avanzado estado de degradación debido al tiempo de almacenaje en hielo. En organismos recién sacrificados con periodos en hielo de más de cuatro horas se observa el típico patrón escalonado de degradación de los ácidos nucleicos. Por esta razón, se aplicaron dos estrategias para asegurar la integridad del genoma de los organismos estudiados:

- a) trasladar a los organismos vivos al laboratorio y un vez ahí disectarlos y procesarlos inmediatamente ó
- b) disectarlos directamente en campo y fijar las muestras con al menos 2 volúmenes de etanol absoluto o comercial (96°).

Mediante este manejo aseguramos la calidad de los ácidos nucleicos que se utilizaron para los estudios moleculares.

Los resultados obtenidos mediante RAPD permiten analizar lo siguiente: a nivel intrapoblacional los niveles de polimorfismo fueron diferentes en cada una de las poblaciones estudiadas; las poblaciones localizadas en el Pacífico (Laguna San Ignacio, Bahía Magdalena y Ecuador) presentaron un nivel de polimorfismo mayor que en aquellas poblaciones que se localizan en el Golfo de California (Guaymas, Bahía Concepción y Bahía de La Paz); aunque este nivel sea más bajo, continúa estando dentro del nivel de polimorfismo descrito para el phylum mollusca, sin embargo en la población de Bahía de La Paz el nivel de polimorfismo no cumple con el descrito para moluscos (25-50%) ya que el nivel que se presenta (21) tiende a estar por debajo del límite inferior .

Por otro lado la heterocigosis promedio esperada fue mayor que la observada presentandose un exceso de organismos heterocigotos. De las seis poblaciones estudiadas sólo Bahía Concepción y Bahía de La Paz presentaron valores de heterocigosis observada promedio menores a 0.100. Sin embargo, al realizar el análisis de *ji* cuadrada no existió diferencia significativa entre la heterosigosis esperada promedio (H_e) y la heterocigosis observada promedio (H_o).

El análisis CLUSTER que se aplicó fue el adecuado ya que permite agrupar las poblaciones de acuerdo a su similitud. En la (figura 6, pagina 45) se observan los fenogramas que relacionan las seis poblaciones de *A. ventricosus* sobre la base de los valores de identidad genética de Nei (1972), obtenidos al analizar aloenzimas y RAPDs observándose que en ambos fenogramas las poblaciones de San Ignacio y Guaymas se hubican dentro del mismo grupo, posiblemente debido a que comparten las siguientes características: se localizan aproximadamente a la misma latitud, son someras y están relativamente protegidas de la influencia de las corrientes. Otras poblaciones que se ubican en un mismo grupo en ambos fenogramas fueron las de Bahía de La Paz y Bahía Concepción, ambas localizadas en la costa occidental del Golfo de California, cabe señalar que la época reproductiva para *A. ventricosus* en el Pacífico va de marzo a junio, coincidiendo con la época del año en la que la circulación del flujo superficial de agua proviene del Pacífico y entra al Golfo a través de una boca persistiendo hacia el norte hasta el mes de agosto (Rosas-Cota, 1997) lo cual favorecería la dispersión de larvas provenientes del Pacífico a lo largo de toda la costa, encontrando en ambas bahías condiciones favorables para desarrollarse.

Por otro lado la elección de los oligonucleotidos es de gran importancia; en este estudio sólo dos de 15 oligonucleotidos probados (tabla 2 pag.29) amplificaron patrones electroforéticos regulares con el ADN de los organismos estudiados. Con el uso de estos dos oligonucleótidos como primers o cebadores para la polimerización se obtuvieron patrones de bandeo diferentes y con variaciones en la intensidad de las

bandas lo cual permitió, sin dificultad discriminar la variabilidad intraespecífica entre los organismos de una misma población y de este modo obtener marcadores específicos para cada población estudiada (banda(s) conservada(s)) (figuras 7-12).

Considerando los resultados anteriores, se infiere que el hecho de que se presente un patrón electroforético variable entre las poblaciones del Pacífico y las del Golfo de California podría ser un indicio de la influencia que existe sobre el flujo genético de estas, ocasionado por las corrientes que se presentan en estas regiones, pudiendo influir considerablemente en la existencia de una variabilidad genética baja entre las poblaciones antes mencionadas.

La caracterización genética de las poblaciones utilizando como técnica la amplificación al azar de ADN polimórfico permite conocer el origen geográfico de un organismo dentro de las poblaciones estudiadas. Sin embargo, como su nombre indica dado que la amplificación es aleatoria se deben monitorear (al menos durante tres temporadas consecutivas) los patrones electroforéticos resultado de la aplicación de la técnica, para comprobar que las secciones de ADN amplificado son marcadores fijos de la población.

Finalmente podemos decir que ésta técnica permite obtener resultados satisfactorios a muy corto plazo y tiene mejor resolución comparado con las técnicas histoquímicas; además este tipo de análisis al considerar características que son reflejo directo del genoma, no están sujetas a la influencia del ambiente o la condición fisiológica de los organismos, como sucede para el caso de aloenzimas. El método de RAPD es eficaz para estudios poblacionales, ya que permite obtener marcadores poblacionales específicos y es aplicable aún cuando el número de muestras es tan pequeño como un organismo ya que en este caso estamos valorando la presencia o ausencia de fragmentos (bandas) de ADN específicos y no

proporciones o porcentajes como en el caso de isoenzimas, sin embargo, tiene un mayor costo económico comparado con las técnicas histoquímicas.

IX. CONCLUSIONES

- Los marcadores genéticos analizados (EST, ALP, G6PDH, LDH y SOD) evidenciaron nueve *loci* en total, de los cuales el locus SOD-2 fue polimórfico para las seis poblaciones estudiadas.
- El polimorfismo promedio obtenido en *A. ventricosus*, se encontró dentro del reportado para el phylum mollusca; sin embargo, la variabilidad genética obtenida con los marcadores genéticos utilizados fue baja.
- Las técnicas de tinción histoquímica permiten obtener buenos resultados en estudios poblacionales, es una técnica de bajo costo; sin embargo necesita un mayor número de muestras para estudiar (por lo menos 50 genomas) y mayor tiempo de procesamiento y manejo para la obtención de un resultado concluyente.
- La técnica de RAPD permitió observar la variabilidad genética que existe entre las poblaciones, así mismo obtener marcadores específicos para cada población.
- La técnica de RAPD se ejecuta en poco tiempo y no necesita un mayor número de muestras para obtener información completa del genoma; sin embargo su costo es mas elevado que las técnicas histoquímicas.

X. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se hacen las siguientes recomendaciones:

- Realizar un monitoreo anual en las zonas estudiadas para observar su comportamiento genético, de esta manera se puede hacer una estimación de la variabilidad genética a través de varias generaciones.
- Realizar monitoreos cuando se presentan los fenómenos El Niño y La Niña, ya que se ha reportado que existe un mayor índice de desoves cuando el agua es más caliente (Niño); de esta manera se puede observar el comportamiento y el estado de salud de las poblaciones.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Borrego S., Galindo-Bect, L. A. y Chee-Barragan A.** 1975. Características hidroquímicas de Bahía Magdalena, B.C.S. Ciencias Marinas. México. pp. 94-110.
- Ahmad, M., Skibinski, D. O. F., y Beardmore, J. A.** 1977. An estimate of the genetic variation in the common mussel, *Mytilus edulis*. *Biochem. Genet* 15:833-846.
- Anonimo,** 1982. Bahía Magdalena to La Paz. Defense Mapping Agency Hydrographic Topographic Center. Omega Chart No.12120. Washington, D.C. USA. En: Urban-Ramírez, J. y Ramírez-Rodríguez M. 1997. La Bahía de La Paz Investigación y Conservación. UABCS-CICIMAR-SCRIPPS. 345 pp.
- Avilés-Quevedo, M.A.** 1990 Crecimiento de la almeja catarina *Argopecten circularis* en función del alimento, con anotaciones sobre su biología y desarrollo. Tesis Maestría. CICIMAR. IPN. México. 81pp.
- Ayala, F. J.** 1980. Evolución Molecular. 1ed. Ed. Omega. p. 21,22
- Ayala , F. J. y J. A. Kiger.** 1984. Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano S.A, México. 813pp.
- Baqueiro-Cardenas, E., Peña-Ramirez R. I. y J. A. Masso-Rojas.** 1981. Análisis de una población sobreexplotada de *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en la Ensenada de La Paz, B.C.S., México. *Ciencia Pesquera* 1(2):57-65.

Baqueiro-Cardenas, E., Masso-Rojas y A. Velez. 1983. Crecimiento y reproducción de un población de caracol chino, *Heraplex erythristomus* (Swainson,1831) de Bahía Concepción, B. C. S. *Ciencia Pesquera* (4):19-31.

Beaumont, A., Catalan-Aleman, I, 1999. Identification of scallop larvae using DNA technology. p.151 In: 12th International Pectinid Workshop 5-11 May 1999 Bergen Norway. 166 pp.

Benzie, J.A.H., Ballment, E. y Frusher, S. 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. En: Gall, G.A.E., Chen, H. (ed.). *Genetics in Aquaculture*. Vol. IV. Amsterdam, Netherlands. Elsevier.

Benzie, J.A.H., Frusher, S. Ballment, E. 1992. Geographical variation in allozyme frequencies of populations of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) in Australia. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, 43(4): 715-725.

Blackburn M. and Throne. R. N. 1974. Composition, biomass and distribution of pelagic nekton in a coastal upwelling area of Baja California. *Tethys* 6, 281-290 En: Maeda-Martínez AN., Reynoso-Granados T., Solis-Marín F., Leija-Tristán A., Aurióles-Gamboa D., Salinas-Zavala C., Lluch-Cota D. and Ormart-Castro P. 1993. A model to explain the formation of catarina scallop, *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835), beds, in Magdalena Bay, Mexico. *Aquaculture and Fisheries Management*, 24:323-339.

Cáceres-Martínez, C., C. Ruiz-Verdugo y M.C. Rodríguez-Jaramillo. 1990. Variaciones estacionales del índice gonádico y muscular de *Argopecten circularis* (Sowerby 1835) en la Ensenada de La Paz, B.C.S., México. *Inv. Mar. CICIMAR*, 5(1):1-6.

Cervantes-Franco, M.A. 1994. Variabilidad genética de dos poblaciones del mejillón *Modiolus capax* (Conrad) (Bivalvia-Mytilidae) del Golfo de California. Tesis de Maestría. CICESE. pp 65.

Cruz-Hernández, P. 1997. Análisis comparativo del crecimiento y supervivencia de dos poblaciones de almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842) y sus cruzas recíprocas en Baja California Sur. Tesis de Mestría CICIMAR-IPN, México. 85 pp.

Cruz-Hernández, P. Ramírez Jose L, García. A. Guy, Ibarra AM.1998. Genetic differences between two populations of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) for adaptations for growth survival in a estressfull environment. *Aquaculture* (166), 321-335.

Cháves,L.S y Schmitter, J.J. 1991. Distribución de sedimentos, materia orgánica, fosfatos y batimetría de la Plataforma de Baja California, México (24-29 N). Informe Geológico No.1 C.I.B. Departamento de exploración y evaluación de recursos marinos. 66 pp.

De la Rosa-Velez, J. 1986. Variabilidad genética poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México. Tesis Doctoral. UNAM. p. 21.

Díaz, H.B. y R.C. Ruvalcaba, 1969. Estudio hidrográfico de la Bahía de Guaymas. Tesis Profesional. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Guaymas, Sonora. 99 pp. En: López-Martínez J. y Nevares-Martínez, M. 1999. Análisis de tres variables oceanográficas de la Bahía de Guaymas, Sonora México. En revisión.

- Dobzhanski, T., Ayala, J. F., Stebbins, G. L., Valentine, J.** 1980. Evolución. Ed. Omega. Barcelona. p. 52.
- Elo, K.** 1995. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, 153 (1-2):55-65.
- Felix-Pico, E. F.** 1993. Estudio biológico de la almeja catrina *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en Bahía Magdalena B. C. S. México. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México. 89 pp.
- Felix-Pico, E. F. y Sánchez-Sánchez R.** 1976. Orientación técnica para el aprovechamiento de los recursos naturales existentes y prácticas de maricultivo en Bahía Concepción y Ensenada de La Paz. Informe Final. Residencia de Acuicultura, S. R. H. La Paz B. C. S. México. 33 pp.
- García, D.K., Benzie, J. A. M.** 1995. RAPD markers of potential use in penaid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture* 130, 137-144.
- García, D.K., Faggart, M.A., Rhoades, L., Alcivar-Warren, A.A., Wyban, J.A., Carr, W.H., Sweeney, J.N. and Ebert, K.M.** 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol. Mar. Biol. and Biotechnology.*, 3(5):270-280.
- Hardy, D.** 1991. Scallop Farming. Fishing News Books. USA. 237 pp.
- Hirschfeld, B. M. Dhar A. and Alcivar-Warren A.** 1999. Genetic diversity in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Masachussetts using the RAPD technique. *J. Shellfish Res.* 18(1): 121-125.

Hunter R. L. and Markert R. L. 1957. Histoquimical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125, 1224-1295. En: Ayala F. J. 1980. *Evolución Molecular*. 1ed. Ediciones Omega. Barcelona. p. 21.

Ibarra AM., Ramírez J.L. García GA. 1997. Stocking density effects on larval growth and survival of two catarina scallop, *Argopecten ventricosus=circularis* (Sowerby II, 1842), populations. *Aquaculture Reserch* 28(6): 443-451.

Jimenez-Illescas, A.F., Obeso-Nieblas, M. y Salas de Leon, D. A. 1997. Oceanografía física de la Bahía de La Paz B. C. S. p. 31. In: Urban-Ramírez, J. y Ramírez-Rodríguez M. 1997. *La Bahía de La Paz investigación y conservación*. UABCS-CICIMAR-SCRIPPS. 345 pp.

Karp, G. 1987. *Biología Celular*. Segunda edición. Ed. McGraw-Hill. México. p. 896.

Keen, M. A. 1971. *Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru*. 2nd. Ed. Stanford Univ. Press. U.S.A. 74-75pp.

Keen and Coan, 1974. In Shumway, E. S., 1974. *Scallop: Biology, Ecology and Aquaculture*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 21. Elsevier N. Y., U. S. A. pp 1095.

Lester, L.J. 1983. Developing a selection breeding program for penaid shrimp mariculture. *Aquaculture* 33, 41-50.

Lewontin, R. C., 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Colombia University New York 346pp. En: De la Rosa-Velez J. y Rodriguez-Romero, F., 1989. *Enfoque genético para el análisis de poblaciones de recursos pesqueros: el caso de*

la laguna de Terminos Campeche. Capitulo 19: 225-284. Temas de Oceanografía Biológica en México. Ensenada 337 pp.

Lewontin, R. C. and Hubby J.L., 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*, *Genetics*, 54: 595-609.

Lora-Vilchis, M.C. and Maeda-Martínez A.N. 1997. Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus=circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with the microalgae species. *Aquaculture Reserch*, 28 (12): 905-910.

Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R.J Randall. 1951. Protein measuremet with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Luna-Gonzalez, A. 1997. Ciclo reproductivo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842), cultivada en la Rada del Puerto de Pichilingue B. C. S. y su relación con el medio. Tesis de Maestria, UABCS, México. 74 pp.

Maeda-Martínez A.N., Reynoso-Granados T., Solis-Marín F., Leija-Tristán A., Aurióles-Gamboa D., Salinas-Zavala C., Lluch-Cota D. and Ormart-Castro P. 1993. A model to explain the formation of catarina scallop, *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835), beds, in Magdalena Bay, Mexico. *Aquaculture and Fisheries Management*, 24: 323-339.

Manchenko, G.P. 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press. Boca Ratón, USA. 341 pp.

Market, C. L. and Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and specific patterns. In: Ayala F. J. 1980. Evolución Molecular. 1ed. Ediciones Omega. Barcelona. p 21.

Mateo-Cid, L. E., I. Sanchez-Rodriguez, Y.E. Rodriguez-Montesinos y M. Casas-Valdez, 1993. Estudio Florístico de las algas marinas bentónicas de Bahía Concepción, B.C.S., México. Ciencias marinas 19 (1):41-60.

Mattoccia, M., La Rosa, G., De Matthaeis, E., Cobolli-Sbordoni, M. y Sbordoni, V. 1986. Patterns of genetic variability and differentiation in Mediterranean populations of *Penaeus kerathurus* (Crustacea: Decapoda). En: Tiews, K. (ed). Selection, hybridization and genetic engineering in *Aquaculture*. Vol. I.

Maynard, S. J. 1989. The variability of natural populations. En: J. Maynard Smith (ed). Evolutionary genetics. Oxford University Press, Oxford. pp. 48-78.

Molina-Galan, D. J. 1992. Introducción a la genética de poblaciones y cuantitativa. 1ra ed. Ed. A.G.T. México. p. XV.

Monsalvo-Spencer, P., Maeda-Martínez A.N. and Reynoso-Granados T., 1997. Reproductivity and spawning induction in the catarina scallop *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). *J. Shellfish. Res.* 16 (1): 67-70.

Morquecho-Escamilla, Ma. L. 1996. Fitoplancton tóxico y actividad de ficotoxinas en la almeja catarina *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835). Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 74 pp.

Nei, M. 1972. Genetic distances between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.

Ochoa-Machetto, 1987. Estudio de la evaluación de la calidad del agua de la bahía de Guaymas. Tesis de Maestría. ITESM, campus Guaymas. 103 p. En: López-Martínez J. y Nevares-Martínez, M. 1999. Análisis de tres variables oceanográficas de la Bahía de Guaymas, Sonora México. En revisión.

Orenzans, J. M, A. M. Parma y O. Iribarne, 1991. Population dynamics and management of natural stocks. En S. E. Shumway (ed.) *Scallops. Biology, Ecology and Aquaculture*. pp. 625-713.

Rámirez-Guillen, D. A., 1983. Sistemática ecológica y biogeografía de los crustáceos decápodos anomuros de Bahía Concepción B.C.S. México. Tesis de Licenciatura. Univ. Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL. 133 pp.

Rodríguez-Jaramillo, M. C., Caceres-Martínez, C y Ruíz-Verdugo C.A. 1997. Resultados preliminares de la biología reproductiva de *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en la ensenada de La Paz B.C.S., durante el periodo de Septiembre 1986 a Octubre de 1987. En: Resúmenes del segundo Congreso AMAC 87, La Paz B.C.S.

Rodríguez-Paz rubio, L. Ma. 1993. Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos en la almeja catarina *Argopecten circularis*. Tesis de licenciatura. UABCS. México. 79 pp.

Ríos C., Sanz S. and Peña J. B. 1999. Genetic relationships between populations of *Pecten jacobaeus* and *Pecten maximus*. En: Book of abstracts 12TH International Pectinid Workshop 5-11 May Bergen Norway.

Ríos C., Serna A., Peña-Yopis, S. and Peña, J. B., 1999. Allozyme variation of two species of *Flexopecten* from Western mediterranean. In Book of abstracts 12TH International Pectinid Workshop 5-11 May Bergen Norway.

Sakallah, S.A., Lanning, R.W. y Cooper, D. 1995. DNA fingerprinting of crude bacterial lysates using degenerated RAPDS primers. *PCR Methods and Applications*, 4:265-268.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition. Vol. I, II y III. Cold Spring Harbor Lab. Press.

Sánchez I., Fajardo M.C. & Oliveiro. 1989. Estudio florístico estacional de las algas en Bahía Magdalena B.C.S. México. *Investigaciones Marinas. CICIMAR. México*. 4, 35-48 pp.

Sicard-Gonzalez, Ma. T. 1999. Temperatura letal media superior y temperatura óptima en una población de almeja catarina (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842) Tesis de maestría. CICIMAR, IPN. México. pp. 95.

Stryer, L. 1990. Bioquímica. 3ra edición. Ed. Reverté, S. A. Barcelona. pp. 44-46

Sunden, S.L.F. y Davis, S.K. 1991. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): A comparision with three natural populations. *Aquaculture*, 97(2-3):131-142.

Swarts S.L. and W.C. Cummings., 1978. Gray whales, *Eschrichtius robustus*, in Laguna San Ignacio Baja California Sur, México. Final Report. Marine Mammal Commision, Whashnton, D.C. p. 9.

- Tripp-Quezada, A.** 1985. Explotación y cultivo de la almeja catarina *Argopecten circularis* en Baja California Sur. Tesis Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz B.C.S México. 267 pp.
- Turner, P. C. Mc Lennan G. A., Bates, A. D. and White, H. R. M.** 1998. Instant notes in molecular biology. Bios Scientific Publishers. New York U.S. A. p. 40
- Valentine, J. W.** 1980. Estrategias genéticas de la adaptación. In Ayala F. J. 1980. Evolución Molecular. 1ed. Ediciones Omega. Barcelona. p 21.
- Villalejo-Fuerte, M.** 1992. Aspectos reproductivos de la almeja catarina *Argopecten circularis* (Sowerby, 1935) en Bahía Concepción, B. C. S., México. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México. 96 pp.
- Villalejo-Fuerte, M. y R. T. Ochoa-Baez,** 1993. El ciclo reproductivo de la almeja catarina *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en relación con temperatura y fotoperiodo, en Bahía Concepción, B.C.S., *Ciencias Marinas* 19(2):181-202.
- Warburg, O and Christian, W.,** 1941. Isolierung and Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochemistry* (310):340.
- Walsh P. B., Metzger, D. A. and Higuchi R.** 1991. Chelex 100 as a medium for simple extration typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4): 506-513.
- Waller, T.R.** 1995. The misidentified holotype of *Argopecten circularis* (Bivalvia: Pectinidae). *The Veliger* 38: 298-303.
- Whitmore W. D.** 1990. Electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management. CRC. Press. Boca Raton Florida. p.10.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J. Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acids Research*, 18(22):6531-6535.

Zouros, E. y Foltz D. W. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia*, 25:583-591.

XII. APÉNDICE

12.1 APENDICE I

12.1.1 Determinación de proteínas por el método Lowry (1951)

Preparación de curva estándar:

No. de tubo.	µg BSA**	µL STD*	µL agua
1	0	0	200
2	2	2	198
3	4	4	196
4	6	6	194
5	8	8	192
6	10	10	190
7	15	15	185
8	20	20	180
9	30	30	170

* Concentración en el espectro.

** Estandar BSA 1 mg/mL

Reactivos requeridos para cuantificar proteínas.

Soluciones stock

A. Na₂CO₃/Na OH 0.2 N 3%

Na ₂ CO ₃	15 gr
Na OH	4 gr
Agua destilada	500 mL

Disolver los reactivos por agitación hasta obtener una solución cristalina.

B. Cu SO₄ 2%

Cu SO ₄	2 gr
--------------------	------

Disolver el sulfato de cobre en 100 mL de agua destilada.

C. Tartrato de Na y K 4%

Disolver 4 gr de tartrato de sodio y potasio en 100 mL de agua destilada.

Preparar la dilución de las muestras 1:500; agregar 200 μ L de la dilución en cada tubo, para el blanco agregar 200 μ L de agua destilada; (cada tubo se hace por duplicado). Agregar en un vaso 48 mL de la solución A y mantenerla con agitación, agregar 1.0 mL de la solución C y 1.0 mL de la solución B, dejar reposar sin agitación 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente agregar a cada tubo 1 mL de la solución anterior y adicionar 100 μ L de reactivo Folin & Ciocalteu's Phenol.

Reactivos requeridos para electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE NATIVA**Soluciones stock****A. Acrilamida-bisacrilamida 30%**

Acrilamida	60 gr
Bisacrilamida	1.6 gr

Disolver en 200 mL de agua destilada. Filtrar con papel Wathman No.1 y almacenar a 4 °C.

B. 1.5 M Tris HCl, pH 8.8

Tris HCl	45.41 gr
Agua destilada	250 mL

Ajustar pH con HCl.

C. 0.5 M Tris HCl, pH 6.75

Tris HCL	15.13 gr
Agua destilada	250 mL

Ajustar el pH con NaOH.

D. Tampón de corrimiento 1 lt (5X)

Tris HCl 6.05 gr

Glicina 28.5 gr

Ajustar el pH a 8.3.

Mezclar 100 mL de buffer 5X con 400 mL de agua destilada para tener una concentración 1X.

E. Tampón de carga

Glicerol 4 mL

Azul de bromofenol 1% 500 μ L

Tris HCl 0.5 M 5 mL

Agregar los reactivos anteriores en un tubo de 15 mL y mezclar por inversión.

F. Persulfato de Amonio 10%

Disolver 10 gr de persulfato de amonio en 100 mL de agua.

Preparación del gel de corrimiento

7.5%	15 mL
Agua destilada	7.05 mL
30 % Acrilamida-Bis	3.9 mL
Tris 1.5M	3.9 mL
10 % APS	150 μ L
TEMED	9 μ L

Preparación del gel de empaquetamiento:

3.5%	5 mL
Agua destilada	2.8 mL
30 % Acrilamida-Bis	0.65 mL
Tris 0.5	1.3 mL
10 % APS	100 μ L
TEMED	5 μ L

12.1.2 Preparación de soluciones para evidenciar actividad enzimática (Manchenko, 1994).

Esterasa (EST)

Solución de tinción

0.05 M Buffer de fosfatos pH 7.2	100 mL
α -Naftil acetato	10 mg
Fast blue RR	50 mg

Disolver el α -Naftil acetato en 1 mL de acetona. Incubar el gel en la solución de tinción en obscuridad a 37 °C hasta que se vea gris oscuro o hasta que aparezcan las bandas negras. Lavar el gel con agua corriente y fijarlo con ácido acético 3 %.

Fosfatasa alcalina (ALP)

Solución de tinción

0.1 M Buffer Tris-HCl pH 9.0	9.5 mL
2 mM MgCl ₂	500 μ L
1% 5-Bromo-4-cloro-3 indolyl fosfato	500 μ L
NBT	20 μ L

Incubar el gel en la solución de tinción en obscuridad a 37 °C hasta que aparezcan las bandas azules. Lavar el gel teñido con agua corriente y fijarlo con ácido acético 3%.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD)

Solución de tinción

0.1 M Tris HCl, pH 8.0	45 mL
glucosa-6-fosfato	20 mg
NADP	10 mg
PMS	1 gr
0.2 M MgCl ₂	5 mL

Incubar el gel de la solución de tinción en la obscuridad a 37 °C hasta que aparezcan las bandas azul oscuro. Lavar el gel revelado con agua corriente y fijarlo con etanol al 50%.

Lactato Deshidrogenasa (LDH)

0.2 M Buffer Tris-HCl pH 8.0	60 mL
0.5 M L-lactato pH 8.0	12 mL
10 mg/mL NAD	2.7 mL
1 mg/ml NBT	6.7 mL
1 mg/ml PMS	6.7 mL

Incubar el gel en la solución de tinción a la obscuridad hasta que aparezcan las bandas azul oscuro. Lavar el gel revelado con agua corriente y fijarlo con etanol 50%.

Superóxido Dismutasa (SOD)

Soluciones stock

EDTA	0.066 gr
Metionina	3.8 gr
NBT	0.12 gr
Riboflavina	0.014 gr
Buffer de fosfatos 50 mM pH 7.8	800 mL

Disolver cada reactivo en 100 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.8.

Mezclar 5 mL de cada solución stock en una botella ámbar, verter sobre el gel y dejar incubar en obscuridad 20 minutos, retirar la solución y enjuagar con agua destilada; para el revelado, colocar el gel bajo una lámpara de luz blanca hasta que el fondo se tome azul violeta y aparezcan las bandas claras.

Después de realizar cada tinción, los geles se colocaron en papel celofán previamente hidratado en agua y se procedió a montarlos para su secado.

12.2 Apéndice II.

12.2.1 Soluciones para aislamiento de ADN.

A. Tampón de lisis

Tris 0.1 M pH 8.0	10 mL
EDTA 0.1 M	20 mL
NaCl 0.15 M	.87 gr
2 % β -Mercaptoetanol	2 mL
4 % Sarkosil	4 gr

Disolver el cloruro de sodio y mezclarlo con los demás reactivos llevarlo a un volúmen de final de 100 mL.

B. EDTA

EDTA 0.5 M	36.54 gr
------------	----------

Disolver en 200 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 N.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

C. Tampón TBE 10X

Tris Base	108 gr
Ácido Bórico	55 gr

Disolver en 600 mL de agua destilada, agregar 40 mL de EDTA, pH 8.0. Aforar a un litro.

D. Tampón de carga

Azul de Bromofenol	0.25%
Sacarosa o glicerol	30%

Disolver el reactivo en agua destilada, agregar el glicerol y llevarlo a un volúmen final de 10 mL

E. TE pH 8.0

Tris HCl 10 mM	5 mL
EDTA 0.5 M	1 mL

Mezclar las soluciones y llevarlas a un volúmen final de 500 mL.

F. TE-ARNasa

TE	998 μ L
RNAasa 10 μ g/ μ L	2 μ L

Mezclar el TE con los dos microlitros de RNAasa.

Preparación del gel 0.8%

Agarosa	0.8 gr
TBE 1X	100 mL
Bromuro de Etidio	3 μ L

Disolver la agarosa en TBE por calentamiento, una vez disuelta agregar el Bromuro de Etidio y dejar enfriar a $-58\text{ }^{\circ}\text{C}$. Verter la solución en un molde y dejar gelificar a temperatura ambiente.